

Caracterização Molecular de Genótipos Seleccionados de Pinheiro Manso para o Controlo da Qualidade do Pinhão

Isabel Evaristo*, Rogério Tenreiro** e Rita Costa*

*Investigador Auxiliar

Estação Florestal Nacional. Departamento de Ecofisiologia e Melhoramento Florestal,
Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-159 OEIRAS

**Professor Auxiliar

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. ICAT – Unidade de Microbiologia,
Biotecnologia e Biologia Molecular, Campo Grande, 1749-016 LISBOA

Sumário. Para analisar a diversidade genética inter e intra populações de *P. pinea*, foram seleccionadas 25 diferentes proveniências oriundas de sete países da orla Mediterrânea (Portugal, Espanha, Itália, Grécia, Marrocos, Turquia e Israel) e sete povoamentos de três Regiões de Proveniência Portuguesas. Estas populações foram analisadas recorrendo a diferentes tipos de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), cpSSR (*chloroplast Simple Sequence Repeat*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSAP (*Sequence Specific Amplification Polymorphism*).

No caso particular dos microssatélites de cloroplasto (cpSSR), não foi detectada variabilidade genética uma vez que se obteve um único haplótipo em todas as populações analisadas. No entanto, com os restantes marcadores detectaram-se diferentes graus de polimorfismo. Com os RAPD, recorrendo a 15 *primers* aleatórios registou-se 52% de polimorfismo. Os nossos resultados demonstraram que os marcadores baseados em retrotransposões (SSAP) foram mais informativos do que os baseados em AFLP. Assim, com os SSAP, foram analisados 232 fragmentos distintos, dos quais 175 se revelaram polimórficos (75%), enquanto que para os AFLP, com as três combinações de *primers* (*EcoRI/MseI*), se obtiveram 132 fragmentos, dos quais 75 (57%) foram polimórficos.

A maior variabilidade genética encontrada registou-se dentro das populações e o índice de diferenciação F_{ST} variou de 7% com AFLP a 11%, com SSAP.

Palavras-chave: diversidade genética; *Pinus pinea*; RAPD; cpSSR; AFLP; SSAP

Molecular Characterisation of Stone Pine's Selected Genotypes for Pine Nut Quality Control

Abstract. In order to assess the genetic diversity, within and among *Pinus pinea* populations, 25 different provenances from seven countries (Portugal, Spain, Italy, Greece, Morocco, Turkey and Israel) and seven Portuguese populations originated from three Provenance Regions were selected. These populations have been analysed using different types of molecular markers: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), cpSSR (*chloroplast Simple Sequence Repeat*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) and SSAP (*Sequence Specific Amplification Polymorphism*).

In the case of cpSSR, no genetic variability was revealed since a single haplotype was obtained for all the populations analysed. However, with the other markers different levels of polymorphism were obtained. RAPD profiles revealed 52% of polymorphic fragments with 15 different primers. Our results showed that SSAP approach was more efficient to retrieve information than AFLP analysis, leading to the highest number of polymorphic fragments obtained and higher levels of estimated genetic diversity. With SSAP, 232 distinct fragments were scored, and 175 were polymorphic (75%), while with the three AFLP primer combination (*EcoRI/MseI*) 132 distinct fragments were produced, with 75 (57%) being polymorphic.

The greater genetic variation was found mainly within populations and the fixation index F_{ST} averaged over loci ranged from 7% with AFLP to 11% with SSAP.

Key words: genetic diversity; *Pinus pinea*; RAPD; cpSSR; AFLP; SSAP

Caractérisation Moléculaire de Génotypes de Pin Pignon Sélectionnés pour le Contrôle de la Qualité du Pignon

Résumé. Pour évaluer la diversité génétique intra et inter populations de *P. pinea*, nous avons sélectionné 25 différentes provenances originaires de sept pays méditerranéens (Portugal, Espagne, Italie, Grèce, Maroc, Turquie et Israël) et sept peuplements dans trois régions de provenance portugaises. Ces populations ont été analysées avec le recours à divers marqueurs moléculaires: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), cpSSR (*chloroplast Simple Sequence Repeat*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSAP (*Sequence Specific Amplification Polymorphism*).

Dans le cas particulier des microsatellites chloroplastiques (cpSSR), la variabilité génétique n'a pas été signalée, étant donné qu'on a trouvé un seul haplo type commun à toutes les populations analysées. Cependant, avec les autres marqueurs moléculaires on a obtenu différents polymorphismes. Chez les RAPD, et en utilisant 15 primes aléatoires, on a enregistré 52% de polymorphisme. Ainsi, nos résultats ont démontré que les marqueurs basés en rétrotransposons (SSAP) ont été plus informatifs que les AFLP. En effet, des 232 fragments analysés avec SSAP 75% ont présenté des niveaux de polymorphisme, tandis que, avec les AFLP et les trois combinaisons de primes (*EcoRI/MseI*), seulement 57% ont été polymorphiques.

On a constaté une plus grande variabilité génétique intra populations et l'index de différenciation F_{ST} a divergé de 7% avec les AFLP et 11% avec les SSAP.

Mots clés: diversité génétique; *Pinus pinea*; RAPD; cpSSR; AFLP; SSAP

Introdução

O pinheiro manso, *Pinus pinea* L., é uma espécie rústica que se encontra bem adaptada ao clima Mediterrânico. A origem exacta da *P. pinea* não é conhecida. Sabe-se, no entanto, que a sua presença na orla Mediterrânea remonta ao final do período Paleolítico, época em que se verificou uma forte expansão [RIKLI (1943, citado em AGRIMI e CIANCIO, 1994)]; BADAL, (1992).

Por se tratar de uma espécie muito apreciada pelos seus frutos e por ser importante para a construção naval, foi

sendo plantada, de forma extensiva, ao longo do Mediterrâneo pelos Etruscos, Gregos, Romanos e Árabes. Mais recentemente, esta espécie foi introduzida no norte de África, principalmente na Tunísia, Argélia e Marrocos, bem como na Argentina e África do Sul (FADY, *et al.*, 2004).

Presentemente, a sua área natural de distribuição circunscreve-se às zonas Norte e Este do Mediterrâneo, de Portugal à Síria, bem como algumas regiões da costa do Mar Negro. A avaliar pela sua actual área de distribuição, tudo nos leva a pensar que a forte pressão

antrópica exercida no passado possa ter influenciado a distribuição geográfica e a diversidade genética da espécie *P. pinea*. Em Portugal, a área ocupada pelos povoamentos dominantes de pinheiro manso representa mais de 2% da área florestal do país (DGF, 2001).

O pinheiro manso constituiu, outrora, um forte impulsionador da nossa economia, devido à exploração da sua madeira, resina e pinhão. Hoje em dia, apenas o pinhão tem expressão digna de nota na economia nacional, sobretudo nas regiões a Sul do Tejo.

Esta resinosa encontra-se por todo o País mas é a Sul do Tejo que ocupa um papel de destaque, nomeadamente nas zonas de Alcácer do Sal e Grândola, onde o comércio de miolo de pinhão representa a principal fonte de rendimento das populações. Devido às excelentes qualidades organolépticas, o nosso pinhão beneficia de grande procura no mercado externo, com destaque para Espanha, Itália, Estados Unidos, Suíça e Alemanha.

Contudo, nos últimos anos o mercado de pinhão tem registado algumas flutuações devido à concorrência do pinhão proveniente de países Asiáticos a preços muito inferiores, facto que se traduz na quebra das exportações (ANUÁRIO VEGETAL, 2004). Face ao exposto, assume grande importância para o sector florestal e para a economia nacional, a incrementação da produção de semente de qualidade, atendendo a que a indústria deste produto representa uma forte componente económica.

Algumas acções com vista ao melhoramento do pinheiro manso

Em 1965, iniciaram-se, sem grande sucesso (ALPUIM, 1999), tentativas de

melhoramento desta espécie com os primeiros ensaios de enxertia para a instalação de um pomar clonal produtor de pinhão na Mata Nacional de Valverde.

Anos mais tarde, já em 1988, BARREIRA e ALPUIM (1988) apresentaram um esboço para um programa de melhoramento de pinheiro manso no "1º Encontro sobre Pinheiro Manso", organizado pela Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais em colaboração com a Administração de Alcácer do Sal.

Desde então, devido em grande parte ao interesse manifestado pelos proprietários florestais e industriais de descasque, têm-se desenvolvido várias acções, nomeadamente cursos anuais de enxertia, para apoiar os privados na instalação e manutenção de pomares clonais para a produção de pinhão. Paralelamente, assegura-se o apoio à silvicultura dos povoamentos já existentes e, mais recentemente, à mecanização da colheita de pinhas (GONÇALVES, 2005).

Depois de muitos anos de persistência, estão em curso, desde 1996, no Departamento de Ecofisiologia e Melhoramento Florestal da Estação Florestal Nacional (EFN) linhas de acção para o estabelecimento de um programa de melhoramento em pinheiro manso cuja finalidade é a valorização do produto final, o pinhão.

Um programa de melhoramento contempla várias etapas importantes. A demarcação de regiões de proveniência e o estabelecimento de ensaios de proveniência (BURLEY e WOOD, 1976) constituem elementos básicos no planeamento de um programa de melhoramento para uma espécie florestal. Por outro lado, é fundamental o conhecimento da variação geográfica da

diversidade genética, para otimizar estratégias de melhoramento e de conservação dos recursos genéticos florestais (BOSHIER, 2000).

Deste modo, com o objectivo de avaliar a variabilidade da espécie *P. pinea* existente em Portugal e comparar o seu comportamento com o das proveniências representativas da sua área de distribuição natural e estudar a interacção genótipo/ambiente, foram estabelecidos, em 1993 e 1999, ensaios de proveniências em diversos locais do País (Tavira, Sines, Escaroupim e Odeleite), onde se tem dado particular ênfase aos estudos de sobrevivência, crescimento e floração (CHEIRA, 1995; CARNEIRO *et al.*, 2000; FREIXO, 2004).

Com base em critérios geográficos e ecológicos, foram, também, delimitadas sete regiões de proveniência de pinheiro manso e duas de área restrita, que irão, também, apoiar a demarcação da Denominação de Origem "pinhão de Alcácer do Sal", bem como de outras denominações que possam vir a ser consideradas (CARDOSO e LOBO, 2001).

A caracterização do pinheiro manso tem sido feita, essencialmente, com base na observação de características fenotípicas qualitativas e sobretudo quantitativas que servem para distinguir clones melhor produtores de pinhão. Contudo, a subjectividade na interpretação de muitas das características dificulta o rigor com que se pode identificar determinado indivíduo.

Assim, tendo como pressuposto que a utilização de marcadores moleculares constitui uma das novas vias de investigação da diversidade genética das florestas, sobretudo quando se trata de melhoramento das espécies de interesse económico (KREMER *et al.*, 1994), recorreremos à capacidade informativa de

marcadores RAPD (WILLIAMS, 1990), AFLP (VOS *et al.*, 1995), cpSSR (VENDRAMIN *et al.*, 1996) e SSAP (KUMAR e HIROCHIKA, 2001) para, a médio/longo prazo, contribuímos para a caracterização da diversidade genética de populações de *P. pinea* e, de certa forma, obter as ferramentas fundamentais para o estabelecimento das bases de um programa de melhoramento genético.

Material e métodos

Material vegetal

As amostras de pinheiro manso utilizadas neste estudo foram colhidas: (1) na estação experimental localizada no Perímetro Florestal da Área de Sines onde se encontra estabelecido um ensaio, desde 1993, com 25 proveniênciasⁱ de pinheiro manso de sete países da bacia Mediterrânica: **Portugal** (PAM, PASE, PPL, PVFC, PVM), **Espanha** (EAN, ECC, ESM), **Itália** (ICC, IDF, ITCE), **Grécia** (GMN, GST), **Marrocos** (MAG, MCSP, MDA, MKH), **Turquia** (TAK, TÇn, TSRK, TKML, TYL, TYK), e **Israel** (ISMCI, ISMC2), (Quadro 1); (2) em sete povoações de três Regiões de Proveniênciaⁱⁱ: dois deles localizados nas Regiões de Proveniência I (Ponte de Lima) e III (Viseu) e, 5 localizados na Região de Proveniência V (Mata Nacional de Valverde, Monte Novo, Pai Sobrado, Palma e Quinta do Sousa) (Quadro 2).

- O estudo da diversidade genética pela análise RAPD incidiu sobre 22 amostras compostas de proveniências de pinheiro manso de sete países diferentes (i. é colheram-se e misturaram-se amostras de agulhas jovens de 25 árvores de uma mesma proveniência e assim sucessivamente para as restantes 21).

- O material vegetal utilizado na análise de microssatélites de cloroplasto refere-se a: (1) 25 amostras compostas e 125 amostras individuais (cinco árvores por proveniência) das 25 proveniências; (2) seis povoamentos de três Regiões de Proveniência (71 indivíduos).

- Para a caracterização da diversidade por AFLP foram analisados: (1) 125 indivíduos do ensaio das 25 proveniências; (2) sete povoamentos das

três Regiões de Proveniência Portuguesa (105 indivíduos, referentes a novas colheitas efectuadas nas herdades de Palma e Quinta do Sousa) (Anexo I).

- O material vegetal analisado no estudo da diversidade genética pela técnica de SSAP foi o mesmo que o usado na análise dos povoamentos por AFLP. Assim, utilizámos 105 indivíduos de três Regiões de Proveniência portuguesas, correspondendo a sete povoamentos.

Quadro 1 - Parâmetros geográficos das 25 proveniências de *P. pinea*

Referência	Proveniência	País	Latitude (°N)	Longitude (°E)	Altitude (m)	Precipitação (mm)
EAN-25	Andaluzia	Espanha	36 20'	65'	631	-
ESM-26	Serra Morena	Espanha	38 10'	40'	743	743
ECC-27	Cordilheira Central	Espanha	40 30'	4 20'	1007	-
GST-2	Strophilia	Grécia	38 08'	21 22'	20	748
GMN-3	Mandraki	Grécia	39 10'	23 24'	24	87.5
ICC-4	Cecina	Itália	43 45'	29'	2-4	847
IDF-18	Duna Felicia	Itália	42 02'	12 27'	5	-
ITCE-6	Tomboli di Cecina	Itália	43 09'	11 17'	5	-
IsMC1-13	Monte Carmelo	Israel	32 45'	35'	400	600
IsMC2-8	Monte Carmelo	Israel	32 45'	35'	400	600
MAG-7	Air Grana	Marrocos	37 46'	27 23'	970	960
MCSP-14	Cap Spartel	Marrocos	35 4'	5 53'	200-1300	887
MDA-20	Dunes D'Adjir	Marrocos	25 13'	3 54'	10	300
MKH-1	Koudia Hamra	Marrocos	35 16'	5 33'	25	594
PAM-11	Amarante	Portugal	41 18'	8 06'	245	1250
PASE-5	Alc. Sal/Ervideira	Portugal	38 15'	8 30'	100	-
PPL-9	Ponte de Lima	Portugal	41 46'	8 36'	300	-
PVFC-22	Viseu/Fig. Campo	Portugal	40 40'	7 54'	443	-
PVM-10	Vieira do Minho	Portugal	41 41'	8 06'	750 800	-
TAK-16	Aydin-Karine	Turquia	37 46'	27 23'	450	-
TKML-17	Kumluca	Turquia	36 17'	30 20'	5	-
TÇn-21	Çanakkale	Turquia	39 40'20	27 06'	370	-
TSRK-19	Serik	Turquia	36 52'05	31 01'	10	-
TYK-12	Yatagan-katranci	Turquia	37 27'	27 55'	100	-
TYL-15	Yalova	Turquia	48 32'	29 22'	500	-

Quadro 2 - Parâmetros geográficos dos sete povoamentos portugueses

Povoamentos	Nº Árvores Analisadas	Região Proveniência	Longitude (E)	Latitude (N)	Altitude (m)
Mata N. Valverde	12	V	8°31'54,1"	38°1'37,6"	101
Monte Novo	10	V	8°39'20"	38°2'42"	89
Pai Sobrado	12	V	8°31'24,8"	38°21'23,9"	47
Palma	17	V	8°34'54"-8°36'08"	38°26'58"-38°27'40"	12-84
Ponte de Lima	12	I	8°30'	41°41'- 41°42'	290
Quinta do Sousa	30	V	8°3'15,3"-8°3'53"	38°33'33,7"-38°35'53"	45-71
Viseu	12	III	7°54'	40°41'	443

Metodologia

Isolamento de DNA

A extracção de DNA foi feita segundo o protocolo do Kit *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) com algumas alterações que permitiram aumentar não só a qualidade do DNA extraído, mas também o rendimento das extracções.

RAPD

Utilizou-se o protocolo de WILLIAMS *et al.* (1990), optimizado para a espécie *P. pinea*, cujas soluções de reacção, com um volume final de 25 µL, de acordo com EVARISTO *et al.* (2002) eram compostas por 0,04U µL⁻¹ de Taq DNA polimerase, 1x tampão tris-HCl 10 mM, 2,5 mM MgCl₂ (Gibco BRL, Life Technologies), 0,2 nM da cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc), 0,2 µM de *primer* (Operon Technologies, Inc) e 30 ng de DNA genómico.

A amplificação realizou-se num termociclador (Biometra) com a seguinte programação: 5 min a 95°C para promover a desnaturação da dupla cadeia de DNA molde, seguida de 44 ciclos de 1 min a 95°C para desnaturação, 1min a 35°C para emparelhamento dos *primers*; e 1 min a 72°C para extensão do *primer*, finalizando com um ciclo de 5

min a 72°C para a extensão final de todas as cadeias simples.

Foram testados no total quarenta *primers* com sequência arbitrária de dez bases cada (*Kits A, C e H* da Operon Technologies, Inc;) e as reacções repetidas três vezes para que a reprodutibilidade dos resultados fosse garantida.

Os produtos de amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose 1,5% (Gibco BRL) com 0,3 µg.mL⁻¹ de brometo de etídio.

CpSSR

Utilizaram-se seis pares de *primers*, *Pt26081*, *Pt36480*, *Pt41093*, *Pt71936*, *Pt87268* e *Pt110048*, (F, *forward*, marcado com fluorocromo; R, *reverse*), específicos para o genoma cloroplastidial e desenhados a partir do genoma de *Pinus thunbergii* Parl., por VENDRAMIN *et al.* (1996).

As análises de amplificação foram baseadas no protocolo de BOTTA *et al.* (2001) e optimizadas para a espécie *P. pinea* (EVARISTO, 2006).

Os fragmentos amplificados foram separados por electroforese capilar utilizando o sequenciador automático *AbiPrism® 310* (Applied Biosystems), e os respectivos tamanhos foram analisados através de *software* próprio *GeneScan®*

*Analysis software (Applied Biosystems)*AFLP

Para as análises de AFLP foi efectuada nova extracção de DNA a partir do material vegetal recolhido, por forma a obter uma concentração aproximada de 200 ng.µL⁻¹ nas soluções de trabalho (CERVERA *et al.*, 2000).

As reacções de AFLP, conforme descrito por VOS *et al.* (1995), foram desenvolvidas utilizando o Kit AFLP Analysis System I (Life Technologies). Aproximadamente 500 ng de DNA genómico foram digeridos com duas enzimas de restrição diferentes, uma de corte longo (*EcoRI*: 5'-G↓AATTC-3') e uma de corte curto (*MseI*: 5'-T↓TAA-3'), durante 2 horas a 37°C, num volume final de 11 µL contendo 10x Tampão T₄ DNA ligase com ATP, 1 mg.mL⁻¹ BSA, 100U T₄ DNA ligase, 500U *EcoRI*, 100U de *MseI* e dois adaptadores, um para a *EcoRI* e outro para a *MseI*. Posteriormente procedeu-se à diluição das misturas de restrição-ligação, pela adição de 189 µL de Tampão 1x TE.

De seguida, os fragmentos foram submetidos a uma reacção de PCR com *primers* pré-selectivos, com sequência complementar à dos adaptadores, acrescidos de um nucleótido arbitrário na sua extremidade 3'. Por último, os fragmentos pré-amplificados foram então submetidos às reacções de amplificação selectiva, utilizando *primers* com a mesma sequência dos *primers* pré-selectivos acrescidos de dois nucleótidos arbitrários na sua extremidade 3' (totalizando três nucleótidos selectivos).

Das 64 combinações de *primers* possíveis, foram testadas 37 combinações e seleccionadas apenas três das melhores combinações tendo por base a reprodu-

bilidade e o grau de polimorfismo obtido nos testes iniciais (E-ACT/M-CTG; E-AAG/ M-CTA; E-AGG/ M-CAC).

Para a análise dos fragmentos procedeu-se tal como para os cpSSR.

SSAP

Os *primers forward* foram desenhados a partir das sequências disponíveis das regiões LTR (*Long Terminal Repeat*) do retrotransposão *gypsy-like* isolado de *Pinus pinaster* PpRT1 (ROCHETA *et al.*, 2006).

Pelo facto da análise SSAP se basear numa técnica similar à técnica AFLP, as reacções iniciais (restrição, ligação e amplificação pré-selectiva) foram idênticas às do protocolo utilizado para AFLP. Assim, na reacção de amplificação selectiva utilizaram-se as várias combinações de *primers MseI* + 3 nucleótidos (M-CAA, M-CAC, M-CAG, M-CAT, M-CTA, M-CTC, M-CTG, M-CTT) com os *primers* marcados, com fluorocromo FAM, correspondentes à região conservada da LTR do retrotransposão (LTR1-*GAAGGAGAGGGGCATGTTAGGT, LTR2-*GGGACAATAGGGGCACAACAA, LTR3-*GTTGTGCCCCTATTGTCCCCAT). As condições da PCR foram exactamente as mesmas utilizadas na técnica AFLP. Com base nestes resultados, seleccionaram-se três combinações de *primers* de retrotransposões que apresentaram as melhores amplificações LTR1/M-CAA, LTR2/M-CAG, LTR3/M-CAC.

*Análise de dados*RAPD

Os padrões de amplificação dos vários *primers*, obtidos para as 22 proveiências em estudo, foram analisados

pelo programa *software* BIONUMERICS versão 1.50 (Applied Maths).

Para avaliar as relações de semelhança entre as amostras analisadas, tratadas pelo *software* BIONUMERICS como OTUs, (*Operational Taxonomic Unit*), consideraram-se os dados do ponto de vista qualitativo (presença/ausência de bandas) e do ponto de vista quantitativo (intensidade das bandas, analisada por densitometria). Deste modo, obtiveram-se duas matrizes de dados (0/1 e valores densitométricos), às quais se aplicaram coeficientes de semelhança para quantificar a similaridade entre pares de OTUs.

A matriz de semelhança, gerada a partir de dados qualitativos, foi baseada no coeficiente de DICE (S_D) (DICE, 1945). A matriz de semelhança, gerada a partir dos valores densitométricos, foi baseada no coeficiente de PEARSON (coeficiente de correlação linear) e permite considerar diferenças de intensidade de amplificação existentes nos perfis RAPD.

A consistência dos agrupamentos formados foi avaliada através do coeficiente de correlação cofenética (ρ) e expressa a correlação entre os valores de semelhança originais da matriz e os valores de semelhança obtidos a partir do dendrograma. Assim, no programa BIONUMERICS foi calculado o coeficiente de correlação cofenética para cada ramo do dendrograma, obtendo-se uma medida efectiva da fiabilidade da representação, de cada sub agrupamento do dendrograma.

AFLP

Partindo do peso molecular dos fragmentos obtidos para cada árvore, foram elaboradas duas matrizes de valores binários (uma referente às

proveniências e outra aos povoamentos) onde a presença de uma banda foi codificada com o algarismo 1 e, a sua ausência com o algarismo 0, através do programa Genotyper 2.5, *Applied Biosystems* (Versão 3.7). Nestas matrizes de dados booleanos, os fragmentos de diferentes massas moleculares (caracteres) constituem as linhas e as árvores em estudo (OTUs) correspondem às colunas.

Proveniências: índices de diversidade

A partir da matriz binária gerada com os dados das diferentes proveniências, estimou-se a semelhança genética (SG) de acordo com o coeficiente de DICE e o agrupamento UPGMA para as proveniências de pinheiro manso. A consistência dos agrupamentos formados foi avaliada através do coeficiente de correlação cofenética que exprime o grau de concordância entre a matriz de semelhança e a matriz de valores cofenéticos permitindo ajuizar se o dendrograma obtido é uma representação aceitável dos dados originais. No programa BIONUMERICS foi ainda calculado o coeficiente de correlação cofenética para cada ramo do dendrograma.

Para avaliar o nível de diversidade genética das várias populações determinaram-se os índices de SIMPSON (SIMPSON, 1949) e de SHANNON-WIENER (JERROLD, 1996).

Povoamentos: análise da variabilidade

Na análise das sete populações (105 indivíduos), avaliaram-se os seguintes parâmetros genéticos: índice de polimorfismo; número de *loci* analisados (*loc*); número de *loci* polimórficos (NPL); proporção de *loci* polimórficos (PLP);

heterozigocidade esperada (H_e) e a repartição da diversidade genética total, pelo método de NEI (1973), que engloba a diversidade genética total (H_T), a diversidade genética dentro das populações (H_w), a diversidade genética média entre populações (H_B) e a diversidade genética entre populações em relação à diversidade genética total (F_{ST}).

No cálculo destes parâmetros genéticos, utilizou-se o programa AFLP-SURV versão 1.0 (VEKEMANS, 2001).

Análise em componentes principais

Para efectuar a ACP, foi utilizado o programa NTSYS-pc (Versão 2.1), através da matriz gerada pelo programa AFLP-SURV, com o índice de LYNCH e MILLIGAN (1994).

Análise de Clusters

Para esta análise foi utilizado o programa NTSYS-pc (Versão 2.1). A topologia da representação UPGMA, baseada no índice de LYNCH e MILLIGAN (1994), foi feita comparando as várias populações e os seus indivíduos dois a dois, com a matriz de correspondência cofenética. A matriz cofenética foi obtida com base também em UPGMA. Efectuou-se a correlação entre as matrizes usando o teste de Mantel (SOKAL e ROHLF, 1997). Neste teste, a hipótese nula refere-se à ausência de associação entre os elementos do par de matrizes. Foi efectuado um teste de z normalizado, no qual o valor observado depois de 1000 permutações deve ser significativamente maior do que o valor que se obtém devido ao acaso, para confirmar a correlação entre as matrizes.

SSAP

Na análise da variabilidade genética pela técnica SSAP avaliaram-se os mesmos parâmetros que foram utilizados para quantificar a variabilidade genética intra e inter populacional através da análise AFLP.

Recorreu-se também à Análise em Componentes Principais e à análise de *clusters* para avaliar a relação entre os agrupamentos formados com base nos marcadores SSAP e a distribuição geográfica das populações.

Resultados e discussão

RAPD

Dos quarenta *primers* testados só quinze foram seleccionados (OPA₀₁, OPA₀₂, OPA₀₄, OPA₀₆, OPA₀₇, OPA₁₀, OPA₁₂, OPA₁₅, OPA₁₆, OPA₁₇, OPA₂₀, OPC₀₈, OPC₀₉, OPC₁₆, OPH₀₁), tendo em conta a produção de bandas polimórficas.

Não foi encontrada variação apreciável nos perfis de RAPD, obtidos para as 22 proveniências. De facto, na análise global com o conjunto dos 15 *primers* observaram-se apenas 52% de bandas polimórficas. No entanto estes resultados são mais elevados do que os obtidos para esta espécie por diferentes autores (FALLOUR *et al.*, 1997; ANZIDEI *et al.*, 2001; GÓMEZ *et al.*, 2002). Porém, mais baixos quando comparados com outras espécies do género *Pinus*: 58,8%, em *Pinus pinaster* (SALVADOR *et al.*, 2000) e 66% em *P. brutia* (KANDEDMIR *et al.*, 2004).

Análise de Clusters

Na análise de *clusters*, foram elaborados dois dendrogramas baseados

em duas matrizes de semelhança (matrizes de associação das OTUs) cujas unidades taxonómicas operacionais são as proveniências e integrando os resultados com o conjunto dos 15 *primers*. Uma das matrizes foi construída utilizando o coeficiente de *DICE* (S_D) e a outra matriz, baseada nos perfis densitométricos, utilizando o coeficiente de correlação de *PEARSON*.

O coeficiente de correlação cofenética obtido nos dois dendrogramas ($\rho=0,70$) foi considerado válido e perfeitamente aceitável. Na matriz de semelhança calculada pelo coeficiente de *PEARSON*, o índice de similaridade variou de 0,76 a 0,92 e todos os agrupamentos e sub agrupamentos tiveram valores de correlação cofenética superiores a 51% e a maioria mais elevados que 70%. Enquanto a matriz de semelhança calculada por *DICE* variou de 0,89 a 0,95 e a maioria dos agrupamentos e sub agrupamentos apresentaram valores mais elevados que 80% dando um bom grau de confiança nas associações obtidas (EVARISTO, 2006).

No dendrograma baseado em perfis densitométricos (Figura 1) visualizaram-se cinco grupos principais: no primeiro aparecem isoladas a proveniência *Strophillia* da Grécia (2) e a Duna Felícia de Itália (18). No segundo grupo estão representadas 14 proveniências subdivididas em dois subgrupos: o primeiro constituído pelas duas proveniências de Israel, três proveniências de Marrocos, Koudia (1), Hamra (7), e Dunes D'Adjir (20) e a Cordilheira Central de Espanha; no segundo subgrupo estão reunidas as quatro proveniências da Turquia, a Aydin-Karine e a Serik com uma elevada proximidade genética ($S_D=0,91$), correspondente às suas características fenotípicas e ainda a Yalova e Kumluca.

No terceiro e quarto grupos surgem respectivamente a proveniência de Vieira do Minho e de Andaluzia. O quinto grupo, cuja semelhança genética variou entre $S_D=0,85$ e $S_D=0,90$, é constituído por três proveniências portuguesas, Ponte de Lima, Alcácer do Sal e Viseu, juntamente com a proveniência Yatagan-Katranci da Turquia.

Através dos dendrogramas obtidos pelos coeficientes de *DICE* e de *PEARSON* não se constatou associação de acordo com as suas origens geográficas, uma vez que as proveniências do mesmo País estavam representadas em diferentes grupos. Esta diferente distribuição entre os indivíduos, que eventualmente se desenvolveram nas mesmas condições ecológicas, só poderá ser explicada por mistura de materiais de reprodução pelo Homem.

Por outro lado, a lacuna relacionada com a disponibilidade de documentos históricos sobre as origens naturais ou artificiais dos povoamentos analisados não nos permite tirar mais conclusões. Apenas se sabe que as proveniências Marroquinas são artificiais e de origem mais recente, dado que foram plantadas há pouco mais de 100 anos (FALLOUR *et al.*, 1997).

Foi também efectuada uma análise de congruência, referente às 22 proveniências analisadas com os oito *primers* que apresentavam mais de 50% de polimorfismo (Figura 2). A análise visual desta matriz, permite-nos referir que a maior congruência entre os agrupamentos resultantes da análise dos perfis obtidos com cada *primer* de RAPD e os resultantes da análise global dos polimorfismos RAPD, com os 15 *primers*, se verificou com o *primer* OPA₀₆ (70,2%) seguido do *primer* OPA₀₂ (54,5%).

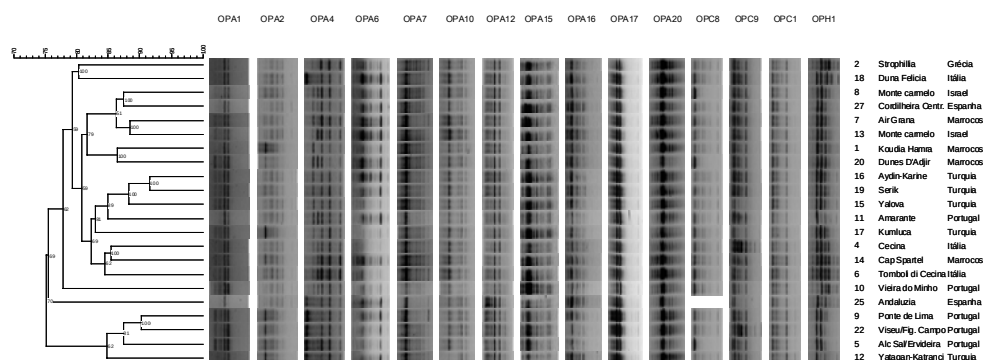


Figura 1 - Dendrograma construído a partir da matriz de valores densitométricos resultante dos perfis RAPD obtidos com os 15 *primers* de 22 proveniências de pinheiro manso, utilizando o coeficiente de *PEARSON* e o método de aglomeração *UPGMA*. Coeficiente de correlação cofenética, $\rho=0,70$. Nível de corte para definição de *clusters* estimado de modo a maximizar a correlação com a matriz original

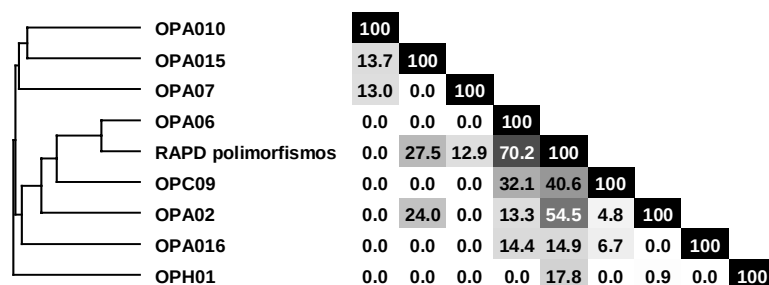


Figura 2 - Congruência entre o agrupamento obtido com oito dos 15 *primers* nas 22 proveniências de pinheiro manso: valores do coeficiente de correlação linear de *PEARSON*, referente a perfis de bandas

A análise RAPD, efectuada, constituiu uma primeira abordagem à caracterização molecular de 22 proveniências de *P. pinea* da orla Mediterrânea instaladas num ensaio em Sines, revelando um nível de polimorfismo de 52%. Embora a variação genética encontrada não seja apreciável, é maior que a encontrada por outros autores em *P. pinea* e menor que em outras espécies.

Quando se procedeu à separação dos indivíduos, os dendrogramas obtidos pelo coeficiente de *DICE* e de *PEARSON* não permitiram uma diferenciação nítida

das proveniências pela sua origem geográfica, visto que proveniências do mesmo País estavam representadas em diferentes grupos.

Uma das limitações da análise RAPD neste tipo de estudo, quando comparada com a utilização de outros marcadores moleculares, é a falta de reprodutibilidade, sobretudo entre laboratórios. Contudo, esta limitação pode ser ultrapassada recorrendo a marcadores mais fiáveis, como os que são discutidos de seguida.

cpSSR

Na avaliação dos seis pares de *primers* cpSSR verificou-se que todos produziram produtos de amplificação. Após uma análise prévia para avaliar o tamanho dos fragmentos e a concentração dos mesmos, efectuou-se uma separação electroforética conjunta para cada três microsatélites, visto que os seus tamanhos não se sobrepunham (agrupamentos específicos utilizados: (Pt26081, Pt36480, Pt41093) e (Pt71936, Pt87268 e Pt110048).

Por vezes, surgiram bandas *stutter* ou outros artefactos separados por um intervalo de um ou dois pares de bases, artefactos muito comuns na análise de microsatélites, e resultantes do não emparelhamento perfeito durante a reacção de PCR (LITT *et al.*, 1993).

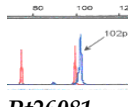
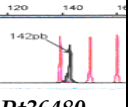
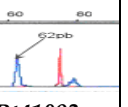
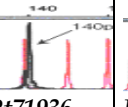
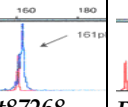
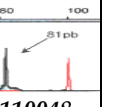
No Quadro 3 apresentam-se os resultados obtidos, para os seis povoamentos, com os seis pares de *primers*. Como se pode verificar, só foi

obtido um haplótipo para cada *locus*.

Os resultados obtidos não permitiram encontrar variação entre as proveniências. De facto, para todos os microsatélites analisados, apenas ocorreram variações na estimativa do tamanho a nível das casas decimais, o que é explicado pela precisão do método de leitura do sequenciador automático. Tendo em conta que é necessário pelo menos um par de bases de diferença entre variantes de um microsatélite para se considerarem diferentes haplótipos, (GOLDSTEIN *et al.*, 1995), confirmou-se a existência de um único haplótipo para todas as proveniências estudadas.

ANZIDEI *et al.* (2001), ao utilizarem nove cpSSR para estimar a variação, inter e intra populacional, em 12 populações de *P. pinea* da sua área de distribuição natural, encontraram apenas um haplótipo na maioria das populações estudadas e três haplótipos nas populações do Líbano.

Quadro 3 - Tamanho dos produtos de amplificação de DNA genómico referente a seis povoamentos de *P. pinea*, com seis pares de *primers* cpSSR de *Pinus thunbergii*

Referência da Amostra						
	Pt26081	Pt36480	Pt41093	Pt71936	Pt87268	Pt110048
Mata N.Valverde Média± SD	102,6±0,23	142,9±0,07	62,7±0,16	140,4±0,07	161,0±0,01	81,6±0,04
Monte Novo Média± SD	102,6±0,22	142,9±0,06	61,9±0,05	140,4±0,06	161,0±0,04	81,6±0,04
Pai Sobrado Média± SD	102,5±0,12	142,9±0,07	62,1±0,13	140,5±0,05	161,0±0,04	81,6±0,06
Ponte Lima Média± SD	102,6±0,22	142,9±0,06	62,0±0,08	140,5±0,06	161,0±0,05	81,6±0,05
Quinta do Sousa Média± SD	102,5±0,15	142,9±0,05	62,0±0,06	140,5±0,06	161,0±0,05	81,6±0,07
Viseu Média± SD	102,5±0,05	142,7±0,07	62,5±0,21	140,2±0,05	161,4±0,07	81,2±0,04
Global/Média± SD	102,6±0,06	142,9±0,09	62,2±0,33	140,4±0,11	161,1±0,14	81,5±0,16

No entanto, GÓMEZ *et al.* (2002) ao analisarem nove cpSSR (*Pt110048*, *Pt15169*, *Pt3025*, *Pt36480*, *Pt41093*, *Pt71936*, *Pt87268* e *Pt9400*) definiram nove haplótipos em 10 populações de *P. pinea* com 240 amostras contra 28 haplótipos em seis populações (144 amostras) de *Pinus halepensis* (GÓMEZ, 1998); 34 haplótipos em 10 populações (240 amostras) de *Pinus pinaster* (VENDRAMIN *et al.*, 1998); 32 haplótipos em 12 populações Portuguesas com 232 amostras de *Pinus pinaster* (RIBEIRO *et al.*, 2001) e 174 haplótipos em sete populações de *Pinus sylvestris* (330 amostras) (PROVAN *et al.*, 1998).

Os mesmos autores também verificaram que o número de alelos obtidos por locus foi muito inferior ao dos microssatélites nucleares obtidos em *Pinaceae* (ECHT *et al.*, 1998), evidenciando a conservação do genoma plastidial comparativamente ao genoma nuclear. Se considerarmos que o tamanho efectivo das populações é metade no caso do genoma do cloroplasto (haplóide) em relação ao genoma nuclear, parece evidente que os factores que afectam o tamanho da população (e.g. fluxo de pólen) afectam de forma mais drástica o genoma plastidial.

Ainda para as mesmas populações de *P. pinea*, o coeficiente de variação inter populacional (F_{ST}), baseado no número de haplótipos determinados por cpSSR, indicou um valor baixo de diferenciação entre as populações (3,81%) e uma maior variabilidade genética dentro da população. Este resultado está de acordo com o esperado quando se trata de coníferas, espécies alógamas com elevada dispersão de pólen, responsável pela herança do cloroplasto, ainda que também possa resultar da intervenção humana na dispersão da espécie (GÓMEZ

et al., 2002).

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.* (2004) testaram 19 microssatélites nucleares de *Pinus taeda* L. e três de *Pinus sylvestris* L. em sete *Eurasian hard pine* (*Pinus uncinata* Rom., *Pinus sylvestris* L., *Pinus nigra* Arn., *Pinus pinaster* Ait., *Pinus halepensis* Mill, *P. pinea* L. e *Pinus canariensis* Sm) e verificaram que o nível de polimorfismo foi variável excepto para a *P. pinea* onde não foi registado polimorfismo.

A falta de polimorfismo obtida para esta espécie parece ser uma constante com este tipo de marcadores moleculares. Facto que não surpreende dado que, também, já se tinham registado baixos valores de heterozigotia com alozimas (FALLOUR *et al.*, 1997). Esta situação é comparável com a de *Pinus resinosa* na América do Norte (ECHT *et al.*, 1998; WALTER e EPPERSON, 2001 e 2005).

A baixa variabilidade observada ao nível do genoma cloroplastidial aponta para a necessidade de procurar diversidade a nível nuclear. Considerando que não existem marcadores de microssatélites nucleares disponíveis para *P. pinea*, e que os nuSSR desenvolvidos para outras espécies de pinheiros não foram bem sucedidos (baixos níveis de amplificação e de polimorfismo), talvez uma nova proposta seja o desenvolvimento de marcadores SSR específicos para esta espécie.

AFLP

Com base no protocolo seleccionado, utilizámos as enzimas *EcoRI* e *MseI* que direccionam a digestão para regiões ricas em A/T. No entanto, o número de fragmentos obtidos pode ser controlado pela utilização de diferentes combinações

de enzimas de restrição. Assim, por exemplo a substituição da enzima *EcoRI* por uma de corte curto (e.g. *TaqI*) levaria ao aumento do número de fragmentos amplificados (PAGLIA e MORGANTE, 1998). Contudo, na maioria das espécies, o problema relaciona-se mais com a redução do número de fragmentos obtidos do que com o seu aumento.

O sucesso da técnica AFLP dependeu essencialmente de uma completa reacção de restrição-digestão, com especial atenção para a utilização de DNA de elevada qualidade, intacto e isento de nucleases ou de inibidores.

Variabilidade genética de proveniências

Neste estudo, das 125 amostras analisadas, verificámos que duas delas (referentes à proveniência 14) apresentaram um electroforetograma anormal, provavelmente devido a uma degradação do DNA ou à presença de inibidores, o que implicou uma digestão incompleta dos fragmentos. Como não foi oportuno procedermos à repetição destas análises, visto que teríamos de iniciar o protocolo desde a extracção, optámos por não as incluir na análise de dados. Apenas foram considerados para análise, os polimorfismos sobre os quais não houve dúvida sobre a sua presença ou ausência de fragmentos, ainda que apresentassem diferentes tamanhos. Também não foram consideradas para análise os fragmentos relativamente aos quais apenas uma linha se revelou polimórfica, evitando assim a influência dos falsos positivos ou falsos negativos que podem ter origem numa digestão enzimática parcial, ou de artefactos da técnica de PCR.

Assim, com as três combinações de *primers* foram detectados 137 fragmentos

AFLP reprodutíveis, 52,6% dos quais polimórficos, que foram utilizados como marcadores para análise da diversidade genética das proveniências. O número total de fragmentos variou de 38 (E-ACT/M-CTG) a 60 (E-AGG/M-CAC), com uma média de 45,7 fragmentos por combinação de *primers*. Também se constatou que a combinação do *primer* E-ACT/M-CTG foi a que proporcionou maior polimorfismo (55,3%) e por isso foi a mais informativa.

De facto, os marcadores AFLP apresentaram uma elevada capacidade para revelar polimorfismos, oferecendo por isso grande potencialidade para determinar diversidade intra e inter-genómica, como se pode demonstrar neste estudo, através da comparação com os marcadores RAPD, onde cinco vezes mais *primers* aleatórios (15) identificaram somente 102 bandas, correspondente a 52% de polimorfismo. O polimorfismo mais elevado obtido com os AFLP *versus* RAPD é consistente com outros trabalhos realizados em diferentes espécies: em 32 cultivares de oliveira (BELAJ *et al.*, 2003); em 25 variedades de *Musa* spp. (UDE *et al.*, 2003).

Análise de Clusters

Os dendrogramas obtidos pelo método de aglomeração UPGMA, utilizando o coeficiente de DICE com o número total de fragmentos de AFLP (137) para cada uma das três combinações de *primers*, apresentaram uma correlação cofenética de 0,64 para a combinação de *primer* (1-7); 0,85 para a (6-5) e 0,78 para a (7-2), enquanto que para o conjunto das combinações de *primers* o coeficiente de correlação cofenética foi de 0,79 (Figura 3).

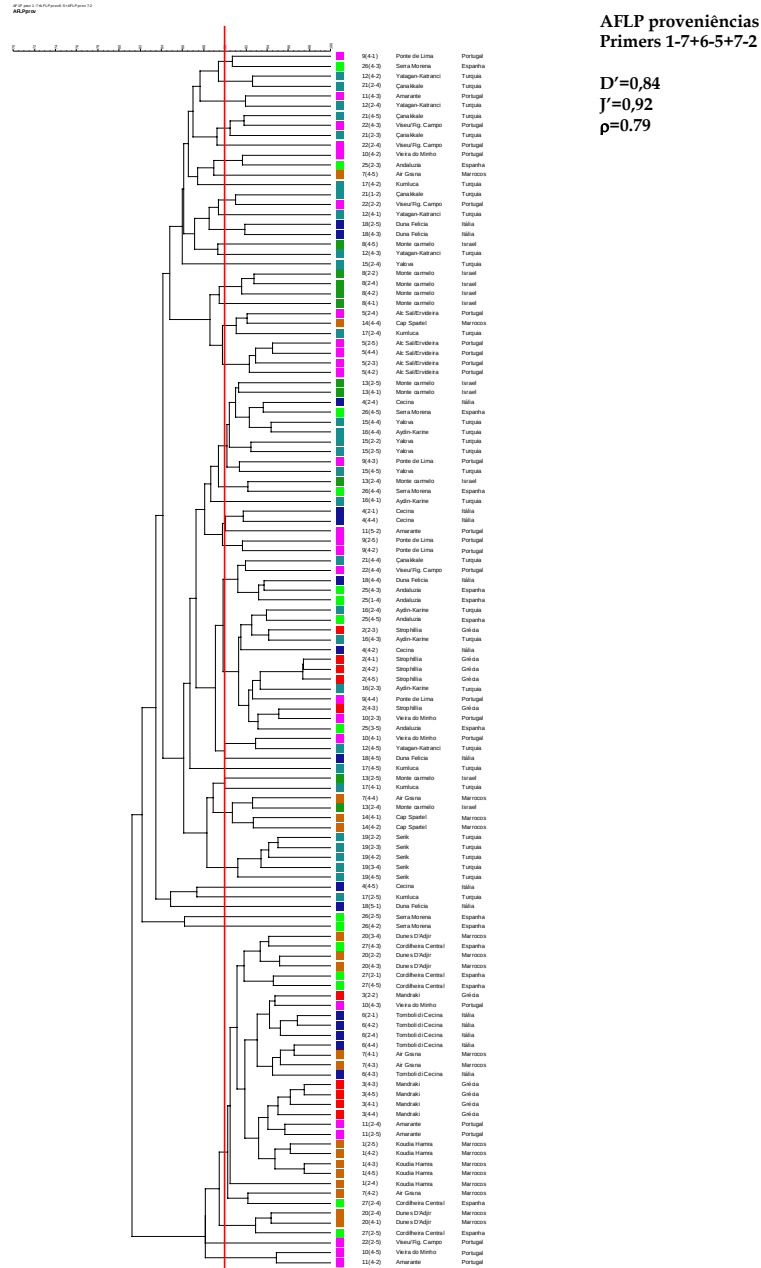


Figura 3 - Dendrograma apresentando o grau de similaridade entre os 123 indivíduos referente às 25 diferentes proveniências de pinheiro manso, através da utilização do coeficiente de *DICE* e o método de *UPGMA*, para o conjunto das três combinações de *primer*. ρ , coeficiente de correlação cofenética; D' , índice de *SIMPSON*; J' , índice de *SHANNON*

Da análise deste dendrograma verificou-se que na maioria dos grupos formados não existiu uma clara diferenciação das proveniências, uma vez que estas se distribuíram pelos diferentes grupos de uma forma quase aleatória. Este facto verifica-se mesmo para os grupos formados com o nível de similaridade mais elevado (90%), essencialmente composto por 40 agrupamentos que não estão relacionados com as distribuições geográficas da espécie. A diversidade genética das proveniências não foi muito elevada, os coeficientes de semelhança estimados baseados nos valores de *DICE* (S_D) variaram entre 0,98 e 0,82.

O poder discriminante de cada *primer* foi caracterizado com recurso ao cálculo dos índices de diversidade de *SIMPSON* (D') e de *SHANNON* (J'). Para o cálculo destes índices aplicou-se um nível de corte arbitrário de 90% para definição dos *clusters* e determinou-se a distribuição das diferentes proveniências pelos grupos formados. No Quadro 4 estão representados os valores obtidos para cada combinação de *primer*. Da observação deste quadro verificou-se que

é possível seleccionar uma combinação de *primers* mais discriminante que as outras. Assim, a combinação E-ACT/M-CTG (1-7) foi a que apresentou valores mais elevados de índice de diversidade $D'=0,89$ e $J'=0,94$, situação igualmente constatada através da proporção de polimorfismos.

No que diz respeito à análise das proveniências de *per si*, verificou-se que apesar da variabilidade ser baixa para todas elas, nalguns casos há uma menor mistura de genótipos e uma maior distinção por origem. Por exemplo, para as proveniências da Grécia verificámos que se distribuíram por dois grupos bem definidos, um com origem *Strophillia* e o outro com origem *Mandraki* (Figura 4).

Relativamente às proveniências Portuguesas, (Figura 5) Alcácer do Sal (5), Ponte de Lima (9), Vieira do Minho (10), Amarante (11) e Viseu/Figueira Campo (22), conseguimos distinguir claramente num agrupamento a proveniência de Alcácer do Sal (5) com um coeficiente de semelhança que variou entre 0,92 e 0,95.

Quadro 4 - Poder discriminante dos *primers*: distribuição dos *clusters* formados de acordo com o número de proveniências e respectivos valores dos índices de diversidade de *SIMPSON* (D') e de *SHANNON* (J'). N: Número total de indivíduos; S: Número de *clusters* formados; Max N: Número máximo de indivíduos por *cluster*

Combinações de <i>Primers</i>	Nível de Corte 90%					
	Referência	N	S	Max N	D'	J'
E-ACT/M-CTG	1-7	123	30	21	0,89	0,94
E-AAG/M-CTA	6-5		14	39	0,76	0,80
E-AGG/M-CAC	7-2		26	34	0,77	0,86
Global*			40	28	0,84	0,92

*Conjunto das três combinações de *primers*

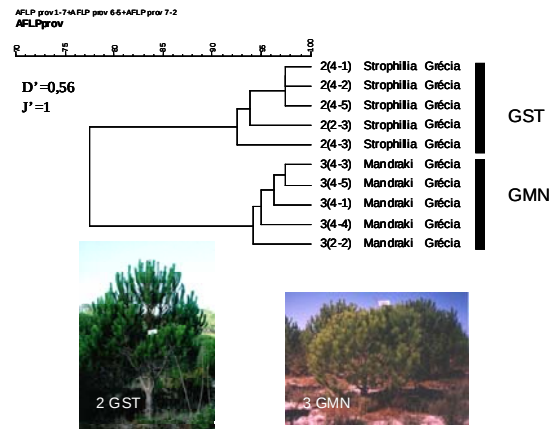


Figura 4 - Dendrograma obtido com o coeficiente de similaridade de *DICE* e o algoritmo de agrupamento UPGMA para os 10 indivíduos das duas proveniências de pinheiro manso da Grécia (2 GST; 3 GMN). D', índice de *SIMPSON*; J', índice de *SHANNON*

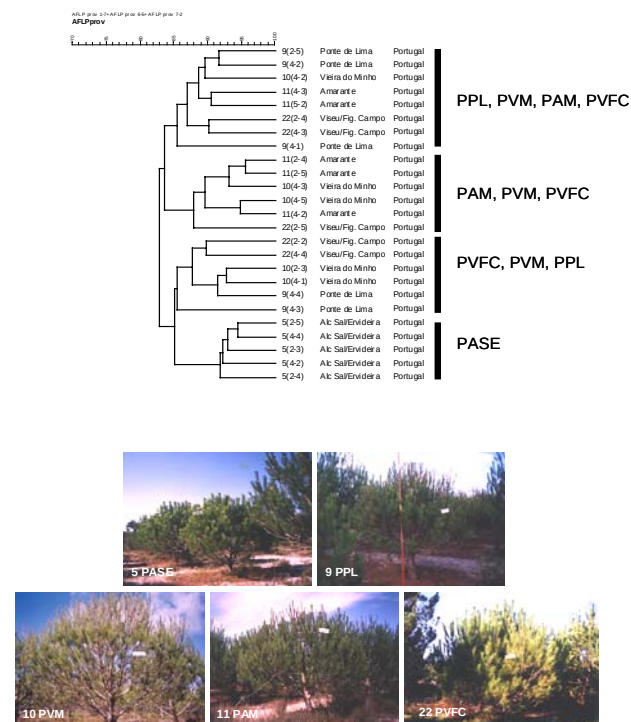


Figura 5 - Dendrograma obtido com o coeficiente de similaridade de *DICE* e o algoritmo de agrupamento UPGMA para os 25 indivíduos das cinco proveniências Portuguesas de pinheiro manso (5 PASE; 9 PPL; 10 PVM; 11 PAM; 22 PVFC). D', índice de *SIMPSON*; J', índice de *SHANNON*

Variabilidade genética de povoamentos

Na quantificação da variabilidade genética intra e inter populacional consideraram-se sete populações portuguesas, constituídas por 105 indivíduos pertencentes a três diferentes regiões de proveniência (Região I, III e V);

Da análise efectuada, verificámos que apenas com três combinações de *primers* foram revelados 75 polimorfismos analisáveis (56,8%) com uma média de 87,3 fragmentos AFLP por indivíduo. A combinação que apresentou maior percentagem de bandas polimórficas (60%) foi a E-AGG/M-CAC, e a que evidenciou a percentagem mais baixa foi a E-AAG/M-CTA (51,3%), sendo por isso a menos informativa para o nosso estudo. No que respeita à proporção de *loci* polimórficos (*PLP*), esta variou entre 23,5% na população de Ponte de Lima e 53,8% no povoamento da Herdade da Quinta do Sousa (Quadro 5). Neste estudo efectuando uma análise global baseado no conjunto das três combinações de *primers*, registaram-se

valores de heterozigocidade esperada (*He*) que variaram entre 0,2571 e 0,3270 valores similares aos observados por outros autores para o género *Pinus*, KIM *et al.* (2005); KANDEDMIR *et al.* (2004).

No Quadro 6 onde se apresentam os valores da heterozigocidade por povoamento para cada combinação de *primers* verifica-se que os valores variaram entre 0,1916 em Viseu, e 0,3419 em Monte Novo, ambos obtidos com a combinação de *primers* E-ACT/M-CTG. Esta combinação de *primers*, tendo evidenciado valores de heterozigocidade mais díspares para as sete populações, foi também a que revelou o valor médio de heterozigocidade mais baixo (0,2531). Também se constatou que os povoamentos Ponte de Lima e Viseu, considerados em termos geográficos isolados da principal área de distribuição desta espécie em Portugal (Região V) e representados por poucos indivíduos, apresentaram os valores médios de heterozigocidade mais baixos (0,2571 e 0,2589, respectivamente).

Quadro 5 - Parâmetros de diversidade genética no conjunto das três combinações de *primers* estudadas (análise global): (*NPL*) número de *loci* polimórficos ao nível de 5% i.e. *loci* com frequências alélicas entre 0.05 to 0.95; (*PLP*) proporção de *loci* polimórficos ao nível de 5%; (*He*) heterozigocidade esperada segundo HARDY-WEINBERG

População	Número de Indivíduos	AFLP		
		<i>NPL</i>	<i>PLP</i>	<i>He</i>
Mata Nacional Valverde	12	48	36,4	0,2723
Herdade Monte Novo	10	56	42,4	0,3270
Herdade Pai Sobrado	12	56	42,4	0,2972
Herdade Palma	17	50	37,9	0,2662
Herdade Quinta Sousa	30	71	53,8	0,2666
Ponte Lima	12	31	23,5	0,2571
Viseu	12	33	42,4	0,2589

Quadro 6 - Valores de heterozigocidade (H_e) encontrados para cada uma das três combinações de *primers*, nos sete povoamentos de *P. pinea*

Combinações de <i>Primers</i> /Referência	Mata Nacional Valverde	Herdade Monte Novo	Herdade Pai Sobrado	Herdade Palma	Herdade Quinta Sousa	Ponte Lima	Viseu	Média
E-ACT/M-CTG (1-7)	0,2258	0,3419	0,2687	0,2673	0,2744	0,2026	0,1916	0,2531
E-AAG/M-CTA (6-5)	0,2874	0,3033	0,2786	0,3117	0,2727	0,3149	0,3315	0,3000
E-AGG/M-CAC (7-2)	0,2938	0,3335	0,3301	0,2331	0,2569	0,2538	0,2540	0,2793
Média	0,2690	0,3262	0,2924	0,2707	0,2680	0,2571	0,2589	-

A comparação dos níveis de variação genética das populações foi realizada com base na avaliação da diversidade genética total (H_T), da diversidade genética dentro das populações (H_W), da diversidade genética entre populações (H_B), e do coeficiente de diferenciação genética (F_{ST}). No Quadro 7 está representada a análise da diversidade intra e inter populacional, para cada uma das três combinações de *primers* e para a análise conjunta. Desta observação, verificou-se que a diversidade total em *P. pinea* foi de 0,3004 e 28% desta diversidade genética foi registada dentro das populações ($H_W=0,2779$).

O grau de diferenciação entre as populações depende da idade de separação da população. Teoricamente, a diferenciação é, relativamente, independente do marcador utilizado, (KREMER e MARIETTE, 2003). No entanto, esta varia, principalmente, com o tamanho da população e com o grau de migração, factores que actuam com a mesma amplitude nos diferentes marcadores (HAMRICK *et al.*, 1992).

Neste estudo, o coeficiente de diferenciação foi de 0,0747 e variou conforme as combinações de *primers* usadas, desde um valor mínimo de 0,0296 no *primer* E-AAG/M-CTA e um máximo de 0,1011 para E-AAG/M-CAC. Esta última combinação de *primers* foi a que diferenciou melhor as populações,

uma vez que apresentou os valores mais altos para este parâmetro.

O valor de variabilidade genética ($F_{ST}=0,074$) foi mais elevado do que os registados, até à data, nesta espécie, utilizando outras técnicas moleculares: isoenzimas 1% (FALLOUR *et al.*, 1997); com cpSSR 3,81% (GÓMEZ *et al.*, 2002). O elevado valor de F_{ST} obtido para *P. pinea* pode dever-se ao facto de termos trabalhado com populações pequenas e com marcadores dominantes (AFLP), que podem levar a uma sobreavaliação dos resultados principalmente, quando as reacções de restrição-ligação não ocorrem na normalidade dando origem a fragmentos de diferentes tamanhos.

Contudo, comparando a diferenciação genética estimada, neste estudo, com os valores obtidos em outros *Pinus* constatou-se que os resultados registados em *P. pinea* são típicos de espécies *outcrossing* $G_{ST}=0,065$, (HAMRICK *et al.*, 1992) e com *P. pinaster*, para os mesmos marcadores, $G_{ST}=0,077$, (SALVADOR *et al.*, 2000); $G_{ST}=0,16$, (PETIT *et al.*, 1995). Ainda em populações de *P. pinaster* mas com utilização da tecnologia de isoenzimas, a diferenciação genética, encontrada por WAHID *et al.* (2004), foi de $F_{ST}=0,104$ enquanto que, com marcadores AFLP, RIBEIRO *et al.* (2002), obtiveram valores de diferenciação de 0,069 e 0,023 respectivamente nas populações Portuguesas e Francesas.

Quadro 7 - Índices de diversidade genética média dos sete povoamentos de *P. pinea* calculados com base nos fragmentos AFLPs obtidos pelas diferentes combinações de *primers* em separado e no seu conjunto. (H_T) diversidade genética total; (H_W) diversidade genética dentro da população; (H_B) diversidade genética entre populações; (F_{ST}) coeficiente diferenciação entre populações

Combinações de <i>Primers</i> /Referência	H_T	H_W	H_B	F_{ST}
E-ACT/M-CTG (1-7)	0,2762	0,2532	0,0230	0,0829
E-AAG/M-CTA (6-5)	0,3091	0,3000	0,0091	0,0296
E-AGG/M-CAC (7-2)	0,3109	0,2793	0,0316	0,1011
Global*	0,3004	0,2779	0,0225	0,0747

*Conjunto das três combinações de *primers*

Uma forte influência do Homem, associada a um fluxo genético extensivo poderá também explicar a diferenciação obtida entre populações, bem como a diversidade encontrada principalmente dentro das populações.

Análise em componentes principais (ACP)

A ACP realizada a partir dos três primeiros factores de correlação sugere uma análise representativa uma vez que abrange mais de 75% da variância total, (factor 1-37%; factor 2-23%; factor 3-16%) (Figura 6). Não foi possível visualizar uma separação nítida de grupos de populações, por regiões de proveniência, excepção para os povoamentos Mata Nacional de Valverde e Palma ambos pertencentes à Região de Proveniência V e inseridos no mesmo subgrupo. Os povoamentos Ponte de Lima (Região de Proveniência I) e de Viseu (Região de Proveniência III) agruparam-se com outros da Região V, enquanto que a população da Quinta do Sousa apareceu mais individualizada.

O facto de não se ter verificado um padrão geográfico de agrupamento firme

podrá ser resultado de uma grande perturbação ao longo do tempo, nomeadamente relacionada com a mistura de sementes de diferente zonas.

Análise de Clusters

A classificação fenética obtida (método UPGMA) está representada no dendrograma da Figura 7. A similaridade das populações agrupadas variou entre 0,02 (2%) e 0,10 (10%). Assim, foi possível agrupar os povoamentos em dois grupos distintos. O primeiro grupo composto por dois subgrupos: do primeiro fazem parte os povoamentos Ponte Lima e Monte Novo, o segundo subgrupo é constituído por Viseu, Pai Sobrado, Mata Nacional de Valverde e Palma. A Quinta do Sousa forma um ramo independente, o que poderá estar relacionado com a localização deste povoamento numa zona menos intervencionada pelo homem.

Tal como na análise ACP, também se verificou que os agrupamentos formados não estão relacionados com a distribuição geográfica das populações. O dendrograma apresentou um coeficiente de correlação cofenética, significativo

($\rho=0,79$; $p<0,01$), evidenciando a existência de um ajuste regular entre a matriz de semelhança e o dendrograma obtido. Este estudo reflectiu valores de diferenciação ($F_{ST}=0,074$) um pouco acima dos registados em coníferas ($F_{ST}=0,065$) e uma fraca estrutura geográfica, uma vez que não foi possível obter

uma diferenciação precisa dos povoaamentos por regiões de proveniência independentemente das técnicas analíticas de dados usadas. A utilização de marcadores moleculares com maior nível de polimorfismo e a análise de populações maiores poderá ajudar a clarificar o padrão de agrupamentos.

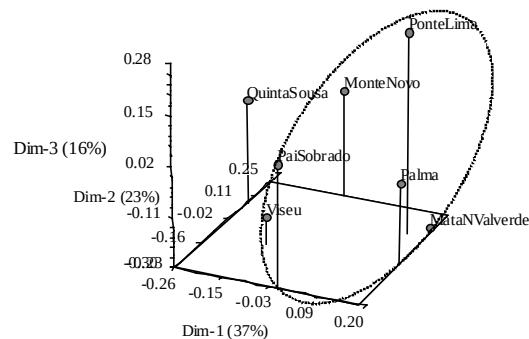


Figura 6 - Distribuição espacial dos sete povoaamentos de *P. pinea*, com base nos três primeiros componentes principais

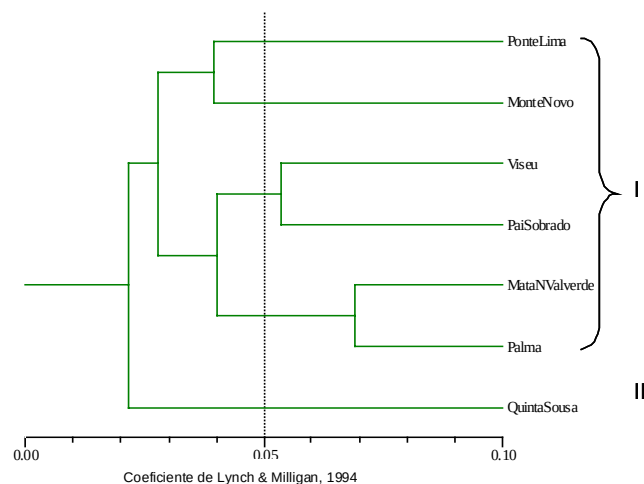


Figura 7 - Dendrograma de sete povoaamentos de *P. pinea*, resultante da análise UPGMA aplicada aos dados moleculares obtidos por AFLP. O coeficiente de similaridade usado foi o de LYNCH e MILLIGAN

SSAP

Os três conjuntos de *primers* originaram 232 fragmentos, 75,4% dos quais foram polimórficos caracterizando um elevado polimorfismo nas populações estudadas (Quadro 8). O número de fragmentos obtidos por combinação de *primers* variou entre 38 e 111, com uma média de 77 fragmentos. A combinação que apresentou a maior percentagem de *loci* polimórficos foi LTR2/M-CAG, com 76,6%.

Tal como esperado, os SSAP revelaram-se mais polimórficos do que os AFLP uma vez que têm maior potencial para produzir marcadores com

forte capacidade de discriminação. Este resultado está em conformidade com o obtido em outros estudos onde foi feita comparação dos marcadores SSAP com RAPD e AFLP (WAUGH *et al.*, 1997; QUENN *et al.*, 2004).

Da análise da diversidade representada no Quadro 9 constatou-se que, para o conjunto das três combinações de *primers*, os valores da proporção de *loci* polimórficos (*PLP*) variaram de 38,4% em Pai Sobrado e 63,4% na Quinta do Sousa, enquanto que os valores de heterozigocidade esperada (*He*) variaram entre 0,2541 e 0,2803 respectivamente em Ponte de Lima e na Herdade Monte Novo.

Quadro 8 - Número de *loci*; número médio de fragmentos/indivíduo; número e percentagem de fragmentos segregados para cada combinação de *primers* e no seu conjunto

Combinações de <i>Primers</i>	<i>loci</i>	Número Médio de Fragmentos /Indivíduo	Fragmentos Segregados	
			Total	%
LTR1/M-CAA	38	19,1	28	73,7
LTR2/M-CAG	111	57,8	85	76,6
LTR3/M-CAC	83	40,4	62	74,7
Global*	232	117,3	175	75,4

* Conjunto das três combinações de *primers*

Quadro 9 - Parâmetros de diversidade genética no conjunto das três combinações de *primers* estudadas: (*NPL*) número de *loci* polimórficos ao nível de 5% i.e. com frequências alélicas entre 0,05 e 0,95; (*PLP*) proporção de *loci* polimórficos a 5%; (*He*) heterozigocidade esperada

População	Número de Indivíduos	SSAP		
		<i>NPL</i>	<i>PLP</i>	<i>He</i>
Mata Nacional Valverde	12	106	45,7	0,2648
Herdade Monte Novo	10	91	39,2	0,2803
Herdade Pai Sobrado	12	89	38,4	0,2662
Herdade Palma	17	113	48,7	0,2616
Herdade Quinta Sousa	30	147	63,4	0,2554
Ponte Lima	12	115	49,6	0,2541
Viseu	12	118	50,9	0,2791

No Quadro 10 referem-se valores de heterozigocidade esperada por combinação de *primers* estudada nos sete povoamentos de pinheiro manso que variou em média por *locus*, entre 0,2397 na combinação de *primers* LTR3/M-CAC e 0,2863 na combinação de *primers* LTR2/M-CAG. Este facto revela uma gama de valores de heterozigocidade média ainda mais reduzida do que no caso dos AFLP, obtida para os diferentes *primers* analisados.

No Quadro 11, está representada a análise da diversidade intra e inter populacional, para cada uma das combinações de *primers* e para a análise conjunta, nas sete populações estudadas. Da observação verificou-se que F_{ST} variou desde o valor mínimo de 0,0823,

na combinação de *primer* LTR3/M-CAG a um valor máximo de 0,1444, na combinação de *primers* LTR1/M-CAA. Consequentemente, esta última foi a que diferenciou melhor os povoamentos.

O facto de o valor médio de F_{ST} ser 0,1058 indica que, aproximadamente, 10% da variação total é atribuída a diferenças entre as populações, sendo que 90% da variação ocorre dentro destas. No entanto, verificou-se uma variação ligeiramente maior de F_{ST} por *loci* com AFLP (0,0296-0,1011) do que com SSAP (0,0823-0,1411). O valor da diversidade genética média registado entre os povoamentos ($H_B=0,0315$) foi aproximadamente 1/8 da diversidade genética média dentro da população ($H_w=0,2660$).

Quadro 10 - Valores de heterozigocidade esperada obtidos com as três combinações de *primers*, nos sete povoamentos de *P. pinea*

Combinações de <i>primers</i>	Mata Nacional Valverde	Herdade Monte Novo	Herdade Pai Sobrado	Herdade Palma	Herdade Quinta Sousa	Ponte Lima	Viseu	Média
LTR1/M-CAA	0,2842	0,3030	0,2838	0,2002	0,2286	0,2608	0,2861	0,2638
LTR2/M-CAG	0,3012	0,3044	0,2985	0,2569	0,2572	0,2646	0,3216	0,2863
LTR3/M-CAC	0,2074	0,2377	0,2151	0,2961	0,2655	0,2370	0,2191	0,2397
Média	0,2643	0,2817	0,2658	0,2511	0,2505	0,2541	0,2756	

Quadro 11 - Índices de diversidade genética média dos sete povoamentos de *P. pinea* calculados com base nos SSAP obtidos pelas diferentes combinações de *primers* em separado e no seu conjunto, (H_T) diversidade genética total; (H_w) diversidade genética média dentro das populações; (H_B) diversidade genética média entre populações; (F_{ST}) coeficiente de diferenciação entre populações

Combinações de <i>Primers</i>	H_T	H_w	H_B	F_{ST}
LTR1/M-CAA	0,3072	0,2638	0,0434	0,1411
LTR2/M-CAG	0,3121	0,2863	0,0258	0,0823
LTR3/M-CAC	0,2735	0,2397	0,0338	0,1239
Global*	0,2975	0,2660	0,0315	0,1058

* Conjunto das três combinações de *primers*

Pela comparação dos valores de heterozigocidade (Quadro 12) obtidos nas análises AFLP e SSAP, verificou-se uma maior diferença de valores em relação às populações Monte Novo, Pai Sobrado e Viseu, esta última sendo a única população com valores H_e superiores em SSAP relativamente a AFLP.

Para os restantes povoamentos obtiveram-se valores muito próximos nos dois tipos de análise.

Com base nos dados do Quadro 13, podemos concluir que os valores dos parâmetros H_T se revelaram próximos nos dois tipos de análise enquanto que H_W , H_B e F_{ST} traduziram valores diferentes, ainda que apresentassem uma variação das frequências génicas dentro das populações superior à variação entre estas. A diversidade genética intra populacional foi mais reduzida para os marcadores SSAP.

Neste estudo, o método baseado em SSAP apresentou valores de F_{ST} superiores (10,58%), resultado que poderá ser proveniente do elevado número de marcadores obtido comparativamente com os AFLP. A técnica SSAP, que

explora a variação provocada pelo movimento dos retrotransposições, revelou também polimorfismos mais elevados em cevada, ervilha, trigo, tomate e pimenta do que com os marcadores AFLP (WAUGH *et al.*, 1997; QUEEN *et al.*, 2004; TAM *et al.*, 2005).

Análise em componentes principais

A análise em componentes principais, baseada nas frequências dos marcadores SSAP, encontrados com as três combinações de *primers* estudados, revelou que os três primeiros factores da ACP explicam 76% da variância total (Figura 8). Cada um dos três primeiros factores possui um valor próprio superior a 16%, acumulando o primeiro factor 37% da variância total.

Visualizando a distribuição dos sete povoamentos através da aplicação da análise em componentes principais, foi possível observar o agrupamento dos povoamentos Ponte de Lima, Monte Novo, Pai Sobrado e Palma, apresentando-se os restantes três povoamentos mais individualizados.

Quadro 12 - Comparação dos valores de heterozigocidade obtidos para o conjunto das três combinações de *primers* na análise AFLP e análise SSAP

Análise	Mata Nacional Valverde	Herdade Monte Novo	Herdade Pai Sobrado	Herdade Palma	Herdade Quinta Sousa	Ponte Lima	Viseu
AFLP	0,2723	0,3270	0,2972	0,2662	0,2666	0,2571	0,2589
SSAP	0,2648	0,2803	0,2662	0,2616	0,2554	0,2541	0,2791

Quadro 13 - Comparação dos parâmetros da diversidade genética H_T , H_W , H_B , F_{ST} , obtidos através da análise AFLP e da análise SSAP

Análise	H_T	H_W	H_B	F_{ST}
AFLP	0,3004	0,2779	0,0225	0,0747
SSAP	0,2975	0,2660	0,0315	0,1058

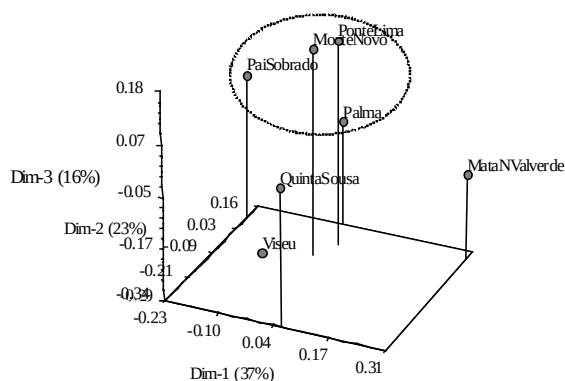


Figura 8 - Distribuição espacial dos sete povoamentos de *P. pinea* com base nos três Componentes Principais

Análise de Clusters

O dendrograma resultante da análise UPGMA, baseada na matriz gerada a partir do programa AFLP-SURV (com o índice de *LYNCH e MILLIGAN*, 1994), confirmou a formação de um agrupamento constituído pelas populações de Ponte de Lima, Pai Sobrado, Monte Novo e Palma (Figura 9). Os povoamentos Visau, Mata Nacional de Valverde e Quinta do Sousa apresentam-se como ramos isolados, por ordem decrescente de similaridade. Observou-se ainda uma maior relação de similaridade entre as populações de Monte Novo e Palma. À semelhança do que ocorreu na análise AFLP, a população da Quinta do Sousa apresentou um maior distanciamento relativamente aos restantes povoamentos. Verificou-se que a análise de relações genéticas confirmou, de um modo geral, a ordenação tridimensional anteriormente efectuada.

O coeficiente de correlação cofenética (ρ) foi de 0,80, evidenciando a existência de um ajuste regular entre a matriz de similaridade e o dendrograma obtido.

Com muito poucas excepções, os valores das distâncias genéticas entre dois genótipos derivadas da matriz de semelhança com SSAP foram superiores aos da matriz derivada de AFLP. No entanto, estes resultados parecem revelar uma estrutura genética, ainda que pouco diferenciada, associada à região de proveniência à qual pertencem os diferentes povoamentos.

Análise global

A optimização do protocolo utilizado para extracção de DNA e dos parâmetros usados nas técnicas de marcadores moleculares, aplicadas neste estudo, foram determinantes para o desenvolvimento do trabalho subsequente.

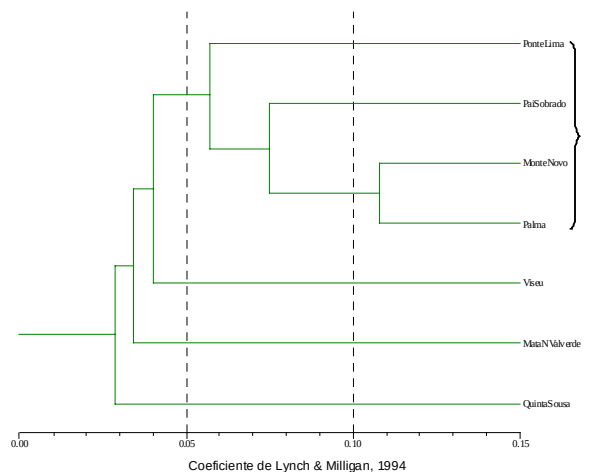


Figura 9 - Dendrograma referente aos sete povoamentos de *P. pinea* resultante da análise UPGMA baseada no coeficiente de LYNCH e MILLIGAN

O método desenvolvido e aplicado para extracção de DNA em pinheiro manso foi importante, uma vez que constituiu factor determinante no nível de qualidade dos resultados obtidos, particularmente na obtenção de fragmentos distintos e definidos. Foi igualmente considerada a reprodutibilidade dos resultados que, em muitos casos, é directamente afectada pela qualidade do DNA isolado, sendo uma exigência de particular importância na técnica de AFLP, onde frequentemente surgem problemas relacionados com este factor.

Da análise geral dos resultados ressalta:

- A análise por marcadores RAPD mostrou baixa variabilidade entre os indivíduos, sem se verificar uma distribuição das proveniências de acordo com as suas origens geográficas.

- Os marcadores microssatélites não forneceram diferenciação entre os indivíduos resultando um haplótipo por locus estudado, resultados que estão em

conformidade com os valores encontrados, nesta espécie, por outros autores. Foi avaliada uma extensa região geográfica com cpDNA, e, no entanto, não foi obtida diferenciação para *P. pinea*, excepto nas proveniências do Líbano.

- Os marcadores AFLP permitem um estudo mais detalhado sobre a existência de diversidade genética entre os indivíduos, uma vez que detectam vários tipos de mutações que possam ocorrer na globalidade do genoma. Assim, na análise das 123 proveniências da Orla Mediterrânica e dos 105 indivíduos de sete populações Portuguesas, com as três combinações de *primers*, obtivemos um total de 137 e 132 *loci* com um polimorfismo, respectivamente, de 52,6% e 56,8%. Observámos valores de diferenciação ($F_{ST}=0,074$) um pouco acima dos registados em coníferas e uma fraca estrutura geográfica, dado que não foi possível obter uma distribuição precisa das populações por regiões de origem.

- Os resultados obtidos até ao momento apontam para um maior poder discriminativo do novo método desenvolvido SSAP ($F_{ST}=0,105$) relativamente aos métodos anteriormente aplicados. No entanto, estes estudos serão continuados utilizando-se informação de sequências adicionais de RTNs para confirmação dos resultados obtidos.

Tal como para AFLP, também estes resultados estão de acordo com os de estudos efectuados em espécies *outcrossing* que indicam que a maior diversidade genética é atribuída às diferenças entre indivíduos dentro de cada população (HUFF, 1993).

Fazendo uma análise geral dos resultados pode concluir-se que nenhum dos marcadores revelou grande diferenciação entre os vários indivíduos.

P. pinea é considerada uma das espécies de coníferas Mediterrâneas que apresenta os mais baixos níveis de variação a nível da sequência do DNA, característica pouco vulgar em espécies com uma área tão alargada. De facto, o pinheiro manso é geneticamente muito uniforme, não se conhecendo na literatura, raízes geográficas, ecótipos ou cultivares. Estudos preliminares com ensaios de proveniência também não indicam qualquer estrutura geográfica forte nas suas características adaptativas (PRADA *et al.*, 1997). A própria aparência estereotipada da sua copa, tão inconfundivelmente familiar aos povos Mediterrâneos, poderá, também, ser atribuída à sua extremamente baixa variabilidade.

Daí que muitas hipóteses tenham sido levantadas por vários autores para explicar a baixa variabilidade genética na espécie *P. pinea*. ANZIDEI e colaboradores (2001) justificam a falta de variabilidade pelo impacto que as populações

humanas exercem sobre as populações florestais. Porém, para GÓMEZ *et al.* (2002), os resultados que obtiveram superaram as expectativas tendo em conta a intervenção humana na dispersão da espécie pelas actividades florestais levadas a cabo na actualidade ou mesmo pela forte pressão antrópica.

Outra hipótese, também sugerida, é a de que a espécie *P. pinea* possa estar a atravessar um estrangulamento genético (*genetic bottleneck*). Sendo os marcadores microsatélites um indicador bastante sensível nos casos de redução do tamanho das populações (PARDUCCI *et al.*, 2001) pode, eventualmente, estar a dar-se um fenómeno desta natureza com esta espécie.

Confinado a uma gama de distribuição durante sucessivos ciclos glaciares-interglaciares, o pinheiro manso poderá (ou não) ter sido submetido a reduções de diversidade genética com o aparecimento da agricultura tradicional e as trocas comerciais a longa distância. Esta hipótese foi igualmente levantada por WALTER e EPPERSON (2001) em relação à espécie *P. resinosa*. Dos seus trabalhos ressalta que esta espécie, no seu todo, perdeu variação pelas sucessivas reduções no tamanho das populações durante o último período glacial.

Perspectivas

Para se poder retirar conclusões mais precisas sobre os resultados encontrados até agora em *P. pinea*, torna-se necessário efectuar estudos sobre um maior número de indivíduos, avaliar populações em áreas consideradas de refúgio (Península Ibérica e Líbano) e, nas áreas onde o tamanho da amostra foi limitado, aumentar o número de *loci* a analisar.

Outra abordagem pode passar pela construção de *primers* específicos para esta espécie ou, então, recorrer à utilização de marcadores que analisem outras zonas do genoma.

A análise da diversidade dos recursos genéticos de *P. pinea*, através da caracterização molecular de proveniências da Orla Mediterrânica e de populações Portuguesas, constitui suporte a programas de melhoramento em curso, e ao planeamento de futuros programas. Neste contexto, a caracterização molecular das populações de pinheiro manso, combinada com a caracterização morfológica e química permitirá estabelecer padrões de identificação que poderão vir a ser utilizados na certificação de proveniências de interesse.

No caso concreto do ensaio de proveniências de pinheiro manso instalado na área de Sines, pretende-se dar continuidade aos estudos de avaliação da variabilidade da espécie e da sua estrutura genética, bem como da interacção genótipo/ambiente com base em determinações biométricas (sobrevivência, vigor, crescimento, produção de pinhas) para definição das melhores origens geográficas e, conseqüentemente, selecção das melhores proveniências com vista a melhorar a produção de semente.

Bibliografia

- AGRIMI, M., CIANCIO, O., 1994. Le pin pignon (*Pinus pinea* L.) 16^{ème} Session du Comité CFFSA/CEF/CFPO des questions fores-tières méditerranéennes *Silva Mediterranea* 13-17 de Juin.
- ALPUIM, M., 1999. O melhoramento ao longo dos tempos. A sua evolução em Portugal. *Seminário O contributo de Melhoramento Genético na Actividade Florestal*. Região Autónoma dos Açores Dezembro, Ponta Delgada.
- ANZIDEI, M., FADY, B., MADAGHIELE, A., SAGNARD, F., VENDRAMIN, G.G., 2001. Near absence of chloroplast micro-satellite variation in *Pinus pinea* L. is due to human impact. Poster apresentado *IUFRO Tree Biotechnology* em 22-27 de Julho.
- ANUÁRIO VEGETAL, 2004. GPPAA - Divisão de Divulgação e Relações Públicas/Castel - Publicações e Edições, SA.
- BADAL, E., 1992. L'anthracologie préhisto-rique: à propos de certains problèmes méthodologiques. *Bull. Soc. Bot. Fr., Actual bot.* 2/3/4: 167-189.
- BARREIRA, L.L., ALPUIM, M., 1988. Contribuição para um programa de melhoramento de pinheiro manso. In *Actas do "Encontro sobre Pinheiro manso"*. SPCF, Alcácer do Sal, 25-26 de Novembro.
- BELAJ, A., SATOVIC, Z., CIPRIANI, G., BALDONI, L., TESTOLIN, R., RLLO, L., TRUJILLO, I., 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationship in olive. *Theor. Appl. Genet* 107: 736-744.
- BOSHIER, D.H., 2000. *Matting systems*. In: *Forest conservation genetics: principles and practice* Chapter 5. Young A., Boshier D.H. Boyle T.J. (Eds) CSIRO, Melbourne, Australia (Book Chapter).
- BOTTA, R., MARINONI, D., BECCARO, G., AKKAK, A., BOUNOUS, G., 2001. Development of a DNA technique for the genetic certification of chestnut cultivars, *For. Snow. Landsc. Res.* 76(3): 425-428.
- BURLEY, J., WOOD, P.J., LINES, R., 1976. A guide to field practice in Burley, J. e Wood P.J. (eds) *A manual on species and provenance research with particular reference to the tropics*, pp. 83-107. Commonwealth For. Univ., Oxford Univ., Oxford, U. K.
- CARDOSO, M.M., LOBO, P.A., 2001. Delimitação de pisos bioclimáticos e regiões de proveniência de pinheiro manso em Portugal, usando sistemas de informação geográfica. *Silva Lusitana* 9(1): 93-108.
- CARNEIRO, M.M., ALPUIM, M., BAETA, J., ROCHA, M.E., CARVALHO, M.A.V., 2000. Ensaio de proveniência de pinheiro manso (*Pinus pinea* L.) resultados dos cinco primeiros anos. Acréscimos em altura. In *Actas 1^{er} Simposio del Pino Piñonero* Valladolid, Tomo II 129-137.

- CERVERA, M.T., REMINGTON, D., FRIGERIO, J.M., STORME, V., IVEN, S.B., BOERJAN, W., PLOMION, C., 2000. Improved AFLP analysis of trees species. *Can. J. For. Res.* **30**: 1608-1616.
- CHEIRA, P.M.D., 1995. *Estudo de Proveniências do Pinheiro Manso*. Relatório de estágio profissionalizante apresentado à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pp. 87.
- DICE, L.R., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26**: 297-302.
- DIRECÇÃO GERAL DAS FLORESTAS, 2001. Inventário Florestal Nacional. Portugal Continental. 3ª Revisão – Setembro de 2001, Recuperado em 2003, Janeiro 10 de World Wide Web: mapas - <http://www.dgf.min-agricultura.pt/v4/dgf/pub.php?ndx=126> tabelas - <http://www.dgf.min-agricultura.pt/ ifn/Tabelas.htm#Tabela%201>
- ECHT, C.S., DEVERNO, L.L., ANZIDEI, M., VENDRAMIN, G.G., 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait.. *Molecular Ecology* **7**: 307-316.
- EVARISTO, I., 2006. *Caracterização molecular de genótipos seleccionados de pinheiro manso para o controlo da qualidade do pinhão*. Tese de Doutoramento. Universidade de Lisboa, pp. 199.
- EVARISTO, I., SEABRA, R., BAETA, J., PAIS, M.S., 2002. Caracterização molecular de proveniências de *Pinus pinea* L. por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) *Silva Lusitana* **10** (1): 53-61.
- FADY, B., FINESCHI, S., VENDRAMIN, G.G., 2004. *EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use of italian stone pine (Pinus pinea L.)*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp. 6.
- FALLOUR, D., FADY, B., LEFEVRE, B., 1997. Study on isozyme variation in *Pinus pinea* L.: evidence for low polymorphism. *Silvae Genética* **46**(4): 201-207.
- FREIXO, J.I.V.C.G., 2004. *Avaliação de um ensaio de proveniências de Pinheiro Manso (Pinus pinea L.)*. Relatório do trabalho de Fim de Curso de Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, pp. 36.
- GOLDSTEIN, D.B., LINARES, A.R., CAVALLISFORZA, L.L., FELDMAN, M.W., 1995. An evolution of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* **139**: 463-471.
- GÓMEZ, A., 1998. *Análisis de la variabilidad genética de poblaciones españolas de Pinus halepensis mediante marcadores RAPD y microsatellites del chloroplasto*. Tesis Doctoral. ETSI Agrónomos Universidad Politécnica de Madrid. Directores: Dra Mª Angeles Bueno Pérez y Dr Ricardo Alía Miranda, pp. 162.
- GÓMEZ, A., AGUIRIANO, E., ALÍA, R., BUENO, M.A., 2002. Análisis de los recursos genéticos de *Pinus pinea* L. en España mediante microsatélites del cloroplasto *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* **11**(1): 145-154.
- GONÇALVES, C., 2005. Técnicas culturais e estrutura dos povoamentos. *I Jornadas de Pinheiro Manso da ANSUB*. Alcácer do Sal 27-28 de Janeiro.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C., ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J., COLLADA, C., DIAZ, A., WILLIAMS, C.G., ALÍA, R., CERVERA, M.T., 2004. Cross amplification and sequence variation of microsatellite loci in *Eurasian hard pines*. *Theor Appl Genet.*, **109** : 103-111
- HAMRICK, J.L., GOH, M.W., SHERMAN-BROYLES, S.L., 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. *New Forests* **6**: 95-124.
- HUFF, D.R., PEAKALL, R., SMOUSE, P.E., 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalegrass (*Buchloe daetyloides* (Nutt.) Engalm) *Theor Appl Genet.*, **86**: 927-934.
- JERROLD, H.Z., 1996. *Biostatistical analysis* Department of Biological Sciences. Northern Illinois University. Third Edition.
- KANDEMIR, G.E., KANDEMIR, I., KAYA, Z., 2004. The pattern of genetic Variation in Turkish Red Pine (*Pinus brutia* Ten.) seed stands as determined by RAPD markers. *Silvae Genetica* **53**(4): 169-175.
- KIM, Z.S., HWANG, J.W., LEE, S.W., YANG, G., GOROVY, P.G., 2005. Genetic variation of Korean Pine (*Pinus koraiensis*, Sieb. et Zucc.) at allozyme and RAPD markers in Korea, China and Rússia. *Silvae Genetica* **54**(4-5): 235-246.
- KREMER, A., DUREL, C-E, PETIT, R.V., VILLAR, M., 1994. Marqueur moleculaire et génétique des arbres forestiers. *Biofutur*, Février, pp. 17-23.

- KREMER, A., MARIETTE, S., 2003. Molecular markers in population genetics. In: de Vienne, D. (ed. *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*, pp. 126-149. Science Publishers, Inc., New York.
- KUMAR, A., HIROCHIKA, H., 2001. Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *Trends in Plant Science* **6**(3): 127-134.
- LITT, M., HAUGE, X., SHARMA, V., 1993. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures, *BioTechniques* **15**: 280-284.
- LYNCH, M., MILLIGAN, B.G., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**: 91-99.
- NEI MASATOSHI, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**: 11-3323.
- PAGLIA, G., MORGANTE, M., 1998. PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes. *Mol. Breed.* **4** : 173-177.
- PARDUCCI, L., SZMIDT, A.E., MADAGHIELE, A., ANZIDEI, M., VENDRAMIN, G.G., 2001. Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species. *Theor. Appl. Genet.* **102**: 733-740.
- PETIT, R.J., BATTRAM, N., MCDEVITT, R., 1995. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology* **5** : 1023-1029.
- PRADA, M.A., GORDO, J., MIGUEL, J., MUTKE, S., CATALÁN-BACHILLER, G., IGLESIAS, S., GIL, L., 1997. *Las regiones de procedência de Pinus pinea L. en España*, pp. 109.
- PROVAN, J., SORANZO, N., WILSON, N.J., McNICOL, J.W., FORREST, G.I., COTTRELL, J., POWELL W., 1998. Gene-pool variation in Caledonian and European scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* **265** : 1697-1705.
- QUEEN, R.A., GRIBBON, B.M., JAMES, C., JACK, P., FLAVELL, A.J., 2004. Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Mol. Gen. Genomics* **271**: 91-97.
- RIBEIRO, M.M., MARIETTE, S., VENDRAMIN, G.G., SZMIDT, A.E., PLOMION, C., KREMER, A., 2002. Comparison of genetic diversity estimates within and among populations of maritime pine using chloroplast simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Ecology* **11**: 869-877.
- RIBEIRO, M.M., PLOMION, C., PETIT, R., VENDRAMIN, G.G., 2001. Variation in chloroplast single-sequence repeats in Portuguese maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) *Theor. Appl. Genet* **102**: 97-103.
- ROCHETA, M., CORDEIRO, J., OLIVEIRA, M., MIGUEL, C., 2006. PpRT1 (*Pinus pinaster* retrotransposon 1): the first gypsy-like retrotransposon isolated in *Pinus pinaster*. *Planta* **225**(3): 551-562.
- SALVADOR, L., ALÍA R., AGÚNDEZ, D., GIL, L., 2000. Genetic variation and migration pathways of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in the Iberian Peninsula. *Theor. Appl. Genet* **100**: 89-95.
- SIMPSON, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* **163**: 688.
- SOKAL, R.R., ROHLF, J., 1997. *Biometry Freeman and Company*, New York.
- TAM, S.M., MHIRI, C., VOGELAAR, A., KERKVELD, M., PEARCE, S.R., GRANDBASTIEN, M.A., 2005. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theor. Appl. Genet* **110**(5): 819-831.
- UDE, G., PILLAY, M., OGUNDWIN, E., TENKOUANO, A., 2003. Genetic diversity in an African plantain core collection using AFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet* **107**: 248-255.
- VEKEMANS, X., 2001. AFLPsurv V.1.0. a software for genetic diversity analysis with AFLP population data, distributed by the author, xvekema@ulb.ac.be, Université Libre de Bruxelles.
- VENDRAMIN, G.G., LELLI, L., ROSSI, P., MORGANTE, M., 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology* **5**(4): 595-598.

- VENDRAMIN, G.G., ANZIDEI, M., MADAGHIELE, A., BUCCI, G., 1998. Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 446-563.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., RIJANS, 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* **23**: 4407-4414.
- WAHID, N., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C., HADRAMI, I.E.L., BOULLI, A., 2004. Genetic structure and variability of natural populations of maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton) in Morocco. *Silvae Genetica* **53**(3): 93-99.
- WALTER, R., EPPERSON, B., 2001. Geographic pattern of genetic diversity in *Pinus resinosa*: area of greatest diversity is not the origin of postglacial populations; *Molecular Ecology* **10**:103-111.
- WALTER, R., EPPERSON, B., 2005. Geographic pattern of genetic diversity in *Pinus resinosa*: contact zone between descendants of glacial refugee. *American Journal of Botany* **92**(1): 92-100.
- WAUGH, R., MCLEAN, K., FLAVELL, A.J., PEARCE, S.R., KUMAR, A., THOMAS, B.B.T., POWELL, W., 1997. Genetic distribution of Bore-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence specific amplification polymorphisms (SSAP). *Mol. Gen. Genet.* **253**: 687-694.
- WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18** (22): 6531-6535.

Entregue para publicação em Outubro de 2007
Aceite para publicação em Novembro de 2007

Anexo I

Representação esquemática das amostras analisadas com cada marcador

Marcador Molecular	Populações	Material vegetal analisado	
		Nº de indivíduos	Referência
RAPD	Proveniências		➤ Amostras compostas do ensaio de proveniências localizado em Sines.
	Proveniências		➤ Amostras compostas do ensaio de proveniências localizado em Sines.
	Proveniências		➤ Amostras individuais do ensaio de proveniências localizado em Sines.
	Povoamentos		➤ Amostras individuais referentes a 6 povoamentos de 3 Regiões de Proveniência Portuguesas (I, III, V).
AFLP	Proveniências		➤ Amostras individuais do ensaio de proveniências localizado em Sines.
	Povoamentos		➤ Amostras individuais referentes a 7 povoamentos de 3 Regiões de Proveniência Portuguesas (I, III, V).
SSAP	Povoamentos		➤ Amostras individuais referentes a 7 povoamentos de 3 Regiões de Proveniência Portuguesas (I, III, V).

ⁱ Proveniências – local onde se encontra uma população de árvores autóctones ou não autóctones.

ⁱⁱ Regiões de Proveniência - territórios onde as condições ecológicas são praticamente uniformes, e nos quais as populações apresentam características fenotípicas ou genotípicas semelhantes.