

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
CIBIO – UP

Variabilidade genética de *Quercus robur* L. em Portugal

Teresa Maria Soares Miguel da Costa Azevedo

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Biodiversidade e Recursos Genéticos apresentado à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Orientadora: Doutora Ana Séneca (Professora Auxiliar, Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto).

Porto
2006

Índice

SUMÁRIO	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJECTIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 <i>Material vegetal</i>	10
3.2 <i>Extracção do DNA total e análise PCR-RFLP do cpDNA</i>	13
3.2.1 <i>Extracção do DNA total</i>	13
3.2.2 <i>Determinação da produtividade da reacção de extracção e da pureza do DNA obtido</i>	14
3.2.3 <i>Condições da reacção de amplificação</i>	15
3.2.4 <i>Digestão enzimática dos produtos de PCR</i>	19
3.2.5 <i>Separação dos produtos digeridos</i>	19
4. REPERCUSSÕES	21
5. BIBLIOGRAFIA	23

RESUMO

As flutuações climáticas do Quaternário tiveram um enorme impacto na biodiversidade actual. As áreas de distribuição das espécies sofreram ciclicamente contracções para Sul, durante as glaciações, e expansões para Norte no final de cada período frio.

Avanços recentes no estudo da distribuição geográfica da diversidade genética conduziram a uma melhor compreensão dos refúgios e das migrações pós-glaciares à escala pan-europeia, tendo as Penínsulas meridionais (Ibérica, Itálica e Balcânica) sido identificadas como refúgios principais para a flora durante os períodos glaciares.

O trabalho proposto tem por objectivo estudar a variabilidade genética de *Quercus robur* L. (carvalho-alvarinho) em populações portuguesas, assim como a dinâmica intra-refúgio, através da utilização de métodos de filogeografia molecular. Os resultados obtidos indicam uma forte estruturação genética nas populações portuguesas de *Q. robur* ($G_{ST} = 0,896$), à semelhança dos resultados obtidos em trabalhos anteriores feitos para a Península Ibérica, bem como níveis de diversidade genética relativamente elevados ($h_T = 0,616$). Este estudo descreve com maior detalhe a composição e a distribuição dos diferentes haplótipos presentes em Portugal e realça a importância que o oeste da península teve como área de refúgio, para a conservação das suas populações e da diversidade genética.

1. INTRODUÇÃO

As plantas demonstram grande diversidade de morfologias, adaptações e características ecológicas, resultado de milhões de anos de evolução. Caracterizar esta diversidade e perceber os mecanismos a partir dos quais ela surge é o grande propósito dos estudos da genética populacional e da sistemática (Ferris *et al.*, 1995; Schaal *et al.*, 1998).

A estruturação genética das populações de plantas é fortemente influenciada tanto pela sua ancestralidade comum como pelos padrões de variação genética que ocorrem actualmente entre elas. A interacção destas duas forças é particularmente complexa. Por um lado, esta complexidade é devida a uma enorme diversidade de estratégias reprodutivas que influenciam o complemento genético e, por outro, ao facto das barreiras reprodutivas serem muitas vezes fracas mesmo entre espécies morfologicamente bem definidas (Schaal *et al.*, 1998).

Nas duas últimas décadas, a filogeografia – o estudo das relações entre a filogenia e a distribuição geográfica dos organismos (Avice *et al.*, 1987) – tem-se tornado numa área bastante popular da ciência evolutiva.

Os métodos filogeográficos proporcionam meios para examinar a história da alteração genética interpopulacional, com o potencial necessário para distinguir padrões biogeográficos de variação genética causados pelo fluxo genético, dos resultantes da sua ancestralidade comum (Schaal *et al.*, 1998). Esta análise permite estudar a geneologia dos seres vivos sobreposta a um esqueleto geográfico, reflectindo, assim, a dinâmica espaço-temporal dos organismos em estudo (Avice, 2000).

Entre os vários factores históricos possíveis como determinantes no padrão de variação genética observado actualmente nas populações naturais da zona temperada, destacam-se as oscilações climáticas ocorridas durante o Quaternário (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Comes & Kadereit, 1998).

1.1 O Quaternário

O final do Terciário (ca. 2,4 m.a. B.P.) deu lugar a um período de grande instabilidade climática, com alternância de fases glaciares e inter-glaciares – o Quaternário (Sobrinho *et al.*, 1996).

Considera-se actualmente que a evolução climática do Quaternário está marcada por uma série de oscilações relacionadas com modificações no balanço energético global do planeta. Deste modo, terá havido períodos em que a quantidade de radiação solar recebida nas latitudes médias diminuiu drasticamente, originando-se Períodos Glaciares, durante os

quais os gelos terão coberto grande parte da Eurásia e América do Norte. Pelo contrário, no decurso dos Períodos Inter-glaciares, mais curtos, as taxas de radiação assumiram valores bastante aproximados dos actuais (Muñoz *et al.*, 1996; Comes & Kadereit, 1998).

As oscilações climáticas do Quaternário tiveram um impacto muito significativo na distribuição das espécies e comunidades vegetais (Comes & Kadereit, 1998) e, conseqüentemente, nos actuais padrões de variação genética nas populações naturais da zona temperada (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997). As áreas de distribuição das espécies sofreram ciclicamente deslocamentos para Sul durante as glaciações, por extinção das populações setentrionais, e expansões para Norte no final de cada período frio (a partir dos refúgios meridionais) por dispersão a partir de uma linha de frente (Castro *et al.*, 2001). Na Europa, estudos filogeográficos têm insistentemente identificado as penínsulas meridionais (Ibérica, Itálica e Balcânica) como refúgios principais da flora durante os períodos glaciares (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Brewer *et al.*, 2002; Olalde *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002 a, b). Foram estes refúgios, localizados mais a sul no continente europeu, que permitiram a sobrevivência de algumas espécies. Contudo, vales encaixados e áreas próximas da influência marítima, poderão também ter funcionado como zonas de acolhimento, ou seja, como micro-refúgios no norte da Península Ibérica, em zonas que estiveram glaciadas (Castro *et al.* 2001).

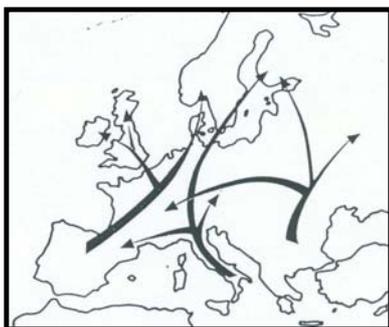


Figura 1: Principais rotas de colonização pós-glacial a partir das três penínsulas meridionais europeias. Figura modificada a partir de Comes & Kadereit, 1998.

Dada a sua importância como refúgio, não é surpreendente que estas três penínsulas contenham uma elevada fracção da biodiversidade europeia no que se refere a espécies destes biótopos.

Perfis paleopolinológicos detalhados têm sido utilizados para reconstruir a localização dos refúgios de várias espécies de carvalho (*Quercus* spp.), para estimar a rapidez com que os bosques temperados se expandiram a partir desses refúgios após o recuo dos glaciares, e para evidenciar a importância das áreas meridionais para a sobrevivência das espécies arbóreas. No entanto, e apesar de serem consideráveis e cobrirem a totalidade do Quaternário, os dados palinológicos tendem a sobre-estimar as espécies das zonas

húmidas envolventes ou com polinização anemófila. Ainda mais importante, a sua resolução taxonómica é limitada (Comes & Kadereit, 1998). O trabalho molecular desenvolvido durante a última década tem contribuído bastante para inferir acontecimentos históricos, revelando padrões da filogeografia intraespecífica de vários *taxa* vegetais (Olalde *et al.*, 2002). Estudos moleculares mais recentes trouxeram novos dados acerca da localização, do número de refúgios e das rotas de expansão pós-glaciar a partir dos padrões geográficos de diferenciação genética de cada espécie, aderindo, assim, aos novos conceitos e aplicações da “filogeografia molecular” (Comes & Kadereit, 1998; Ferris *et al.*, 1995, 1998; Petit *et al.*, 2003). No entanto, muito pouco se sabe sobre a dinâmica intra-refúgio, nomeadamente no que respeita aos micro-refúgios e a padrões de recolonização.

1.2 Estudos filogeográficos em *Quercus* spp.

Durante vários anos, a filogeografia teve um impacto muito maior na investigação de sistemas animais, uma vez que, a maior variedade de estratégias reprodutivas que se verificam nas plantas (multiplicação vegetativa, autofecundação, etc) tornam estes estudos bastante mais complexos (Schaal *et al.*, 1998). Um dos problemas iniciais foi a falta de marcadores moleculares que traduzissem variação genética aplicável à análise filogeográfica nas plantas.

A reduzida taxa de evolução do DNA cloroplastidial (cpDNA), tanto ao nível estrutural, como da própria sequência (Wolfe *et al.*, 1987), limitou, durante muitos anos, o seu uso como fonte de variação genética nos estudos populacionais infraespecíficos (Ferris *et al.*, 1995). Contudo, sabe-se actualmente que a informação genética presente no cpDNA é de grande interesse para os estudos de filogenia e genética populacional, principalmente, devido ao seu modo de transmissão tipicamente uniparental (Demesure *et al.*, 1995).

O pólen e as sementes são os principais veículos para a dispersão da informação genética nas plantas. A informação genética dos cloroplastos (cpDNA) é herdada maternalmente na maioria das Angiospérmicas, incluindo no género *Quercus* (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997), não sofrendo fenómenos de recombinação genética. Consequentemente, os padrões de variação do cpDNA reflectem apenas o fluxo genético através das sementes. Não há, portanto, uma homogeneização do cpDNA de diferentes populações e, assim, o marcador cloroplastidial dispõe de níveis mais elevados de variação intrapopulacional, quando comparado com marcadores nucleares (Petit *et al.*, 2002 a).

O facto da molécula circular do cpDNA ser uma estrutura bastante conservada permitiu o desenho de pares de *primers* universais para a maioria das plantas terrestres (Taberlet *et al.*, 1991; Demesure *et al.*, 1995). Estes *primers* emparelham com regiões codificantes

conservadas do cpDNA, permitindo a amplificação de regiões não codificantes. Estas regiões amplificadas devem exibir níveis mais elevados de polimorfismos, uma vez que estão menos sujeitas à acção da selecção para manter a função dos genes (Hamilton, 1999).

Um vasto estudo europeu sobre a variação do cpDNA em *Quercus* spp. foi já desenvolvido (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Kremer, 2002), tendo confirmado a existência de polimorfismos que estão distribuídos de acordo com as rotas de expansão pós-glacial a partir dos três refúgios europeus. Foram identificados 45 haplótipos (variantes cloroplastidiais) de carvalhos caducifólios e marcescentes através de técnicas PCR-RFLP, usando quatro combinações de *primer* / endonuclease. Foram descritas as relações filogenéticas entre esses haplótipos, e foram estudados os padrões de diversidade como uma função da região e da espécie (Petit *et al.*, 2002 b).

1.3 A ecologia do carvalho-alvarinho

O carvalho-alvarinho é uma espécie presente na maioria da Europa e em algumas partes da Ásia e Norte de África. Em Portugal encontra-se restrito ao Noroeste embora se possam encontrar algumas pequenas populações mais a Sul.

Os bosques de carvalho-alvarinho (*Quercus robur*) são os bosques climatófilos típicos da generalidade dos territórios do Noroeste de Portugal Continental representando a vegetação climácica das tesselas climatófilas. De facto, o carácter predominantemente submediterrânico do bioclima Temperado Oceânico do território favorece a instalação de bosques dominados por carvalhos (*Q. robur*, *Q. pyrenaica*), em detrimento das espécies dominantes sob bioclimas eutemperados (sem diminuição significativa das precipitações durante o estio), como é o caso da faia (*Fagus sylvatica*). Por outro lado, a abundância (anual e estival) das precipitações e a oceaneidade geral do clima favorece o carvalho-alvarinho face ao carvalho-negral (*Q. pyrenaica*), pelo que a generalidade do território apresenta como vegetação potencial um carvalhal de *Q. robur* (Honrado, 2003).

Segundo Castro *et al.* (2001), os carvalhais, por serem menos exigentes em nutrientes do que os faiais ou os bosques mistos de folhosas, constituem a vegetação climatófila oligotrófica dos territórios eurossiberianos colinos e montano-inferiores da Península Ibérica. Segundo os mesmos autores, o carvalho-alvarinho é também uma árvore algo mais heliófila do que a faia ou outras árvores dos bosques caducifólios, pelo que suporta uma desidratação algo mais acentuada. Para tal contribuem as suas folhas um pouco mais xeromórficas e a melhor condutividade dos seus vasos xilémicos, bem como, indirectamente, a sua relativa tolerância face aos solos mal drenados e pouco arejados.

Nestes carvalhais atlânticos, situados geralmente em encostas oligotróficas, o elenco florístico é maioritariamente constituído por plantas acidófilas, tal como *Q. robur* é.

A vegetação climácica, como é o caso dos carvalhais autóctones, é o modelo biológico ideal para avaliar a relação entre o clima e as paisagens naturais. Existem várias razões que explicam a escolha de *Quercus robur* (carvalho-alvarinho) como material de estudo deste trabalho proposto:

- i. Foram as espécies caducifólias de carvalhos que recolonizaram a maior parte das florestas temperadas da Europa, a partir de refúgios a Sul (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997);
- ii. Apesar de cada espécie ter uma resposta individual à mudança climática, como estas florestas albergam uma grande riqueza de outras espécies, algumas delas podem ter seguido padrões de recolonização semelhantes. Assim, o conhecimento preciso da filogeografia dos carvalhos à escala continental pode ser importante para além do estudo de expansão/contracção das áreas de ocorrência dos carvalhos em si (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Petit *et al.*, 2002 b);
- iii. Os carvalhos são espécies anemófilas, produtoras de grandes quantidades de pólen. Este pode ser recuperado de sedimentos antigos, o que significa que, para além da informação molecular, se pode validar, de forma independente e precisa, informação palinológica sobre a localização de refúgios e velocidade e rotas de recolonização, quando comparada com a informação dos dados moleculares (Petit *et al.*, 2002 b);
- iv. São das espécies com maior importância económica e ecológica na Europa (Petit *et al.* 2002 a; Petit *et al.* 2002 b);
- v. Por fim, nos estudos europeus, o número de amostras portuguesas estudadas cobre uma área restrita da distribuição de *Q. robur* no país.

O conhecimento das consequências genéticas, provocadas pelas flutuações dos padrões de distribuição causados pela história geológica recente nas espécies de plantas lenhosas, é crítico para a conservação e a gestão sustentável dos recursos genéticos com importância económica e ecológica indiscutível .

1.4 Objectivos

O objectivo geral deste trabalho consiste na comparação de padrões de variação genética para um conjunto de populações portuguesas de *Quercus robur*, no sentido de deduzir a estrutura filogeográfica geral a nível intraespecífico.

Particularizando, pretende-se:

- i. Determinar a distribuição da diversidade genética intraespecífica para um conjunto de populações de *Quercus robur* no Oeste da Península Ibérica;
- ii. Procurar padrões comuns de divergência e colonização para estas populações;
- iii. Perceber se esses padrões são influenciados pela ecologia própria da espécie;
- iv. Compreender a dinâmica da vegetação do Quaternário no Ocidente da Península Ibérica;
- v. Explicar a actual distribuição do *taxon* em estudo e das comunidades vegetais que integram;
- vi. Combinar os dados obtidos com os provenientes de projectos relacionados, em que são usados modelos animais, de forma a estabelecer um modelo geral da dinâmica dos *biota* do Oeste da Península Ibérica durante o Quaternário.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram feitas colheitas em Portugal Continental de um total de 193 indivíduos a partir de 39 populações nativas de *Quercus robur* L. (carvalho-alvarinho). De modo a facilitar a identificação da espécie, as colheitas foram feitas na Primavera, quando as árvores já apresentavam folhagem. A identificação taxonómica baseou-se em caracteres morfológicos usando a nomenclatura de Castroviejo *et al.* (1986-2001). O esquema de amostragem seguiu a distribuição contínua da espécie, mas foram também incluídas populações relicticas localizadas fora dessa área de distribuição. A desigual distribuição de *Q. robur* no nosso país conduziu a um esforço de amostragem mais intenso em determinadas áreas, relativamente a outras. Como regra geral, em cada floresta foram amostradas cinco árvores à distância mínima de 50 m (de forma a reduzir a amostragem de indivíduos aparentados) e máxima de 500 m (Petit *et al.*, 2002 a). Nalguns casos (tabela 1), apenas três indivíduos foram amostrados. O material foi colhido em árvores adultas de bosques antigos, de modo a reduzir o risco de amostrar populações plantadas ou semeadas em vez de populações nativas. Não foram amostradas árvores de origem artificial suspeita (plantações jovens, árvores em parques ou ao longo de estradas, etc.). Contudo, na tentativa de diferenciar material de proveniência exótica, não foi levado a cabo nenhum estudo baseado em registos históricos de plantações.

As coordenadas UTM foram obtidas com um GPS MAGELLAN™ SportrakPRO ou a partir de mapas topográficos – Cartas Militares de Portugal do Instituto Geográfico do Exército, escala 1:25000.

O material vegetal (folhas jovens ou gomos) de cada árvore foi colhido, seco com papel absorvente, colocado num saco de plástico zip com sílica gel azul grossa e armazenado num recipiente hermético para se manter fresco durante o transporte até ao laboratório. De seguida, foi usado directamente na análise molecular ou armazenado a -20 ou -80°C.

Na tabela 1 está sumariada a informação relativa a cada população: código da população amostrada, nome do local onde foi feita a colheita, coordenadas geográficas (UTM 1x1 km) e altitude.

Tabela 1: Informações relativas a cada população amostrada – código da população, nome do local onde foi feita a colheita, coordenadas geográficas (UTM 1x1 km), altitude e número de indivíduos amostrados por população.

Código	Localidade	UTM	Altitude (m)	Nº de ind./ pop.
A1	Gerês (Ponte de Seara)	29TNG6616	170	5
A2	Gerês (Barragem de Salamonde)	29TNG7516	280	5
A3	Gerês (Albergaria – Fonte da Balsada)	29TNG6926	660	5
A4	Gerês (Fradelos)	29TNG7417	300	5
A5	Várzea Cova (Portela de Galego)	29TNF7796	580	5
A6	Serra d'Arga (Lugar da Castanheira)	29TNG2434	350	5
A7	Ponte de Lima (Carvalhal da Boalhosa)	29TNG4120	356	5
A8	Serra de Montemuro (Soutelo)	29TNF8140	530	5
A9	Gerês (Pontelha – Freitas)	29TNG6517	390	5
A10	Gerês (Chalé do Parque)	29TNG6920	390	5
A11	Gerês (Albergaria – Rio do Forno)	29TNG7227	680	5
A12	Gerês (entre Paradamonte e Soajo)	29TNG6035	200	5
A13	Gerês (Senhora da Peneda)	29TNG6447	650	5
A14	Gerês (Portela)	29TNG7053	1000	5
A15	Gerês (Ameijoeira – Pontes)	29TNG6948	750	5
A16	Gerês (Leonte – Mourô)	29TNG7124	1100	5
A17	Gerês (junto da Barragem de Paradela)	29TNG8725	800	5
A18	Gerês (Covelães)	29TNG9129	1000	5
A19	Paredes de Coura (Corno do Bico)	29TNG4137	650	5
A20	Cabeceira de Basto (Caves)	29TNF9296	190	5
A26	na estrada nacional N1308	29TNF9662	439	5
A28	Serra de Valongo (Ponte de Couce)	29TNF4356	80	5
A29	Serra do Caramulo (Rua)	29TNE6897	500	5
A30	Serra do Caramulo (Pinoucas)	29TNE6993	900	5
A32	Serra do Buçaco (caminho Cruz Alta)	29TNE5468	540	5
A34	Serra da Boa Viagem	29TNE1049	180	5
A36	Serra da Lousã (Vilarinho)	29TNE6742	250	5
A37	Serra da Lousã (Lomba)	29TNE7628	326	5
A45	Serra de Sintra (Cabeço do Outeiro)	29SMC5992	350	5
A63	Porto Carvoeiro (na estrada nacional N223)	29TNF4744	50	5
A65	Amieiro (rio Tua)	29TPF3471	245	3
A66	Moimenta da Beira	29TPF0539	600	5
A67	Vale do Rio Paiva (Reriz)	29TNF8528	350	5
A68	Bodiosa a Velha	29TNF8408	450	5
A69	Vale do Mondego	29TPE1089	240	5
A70	Serra da Estrela (entre Aldeias e Mangualde da Serra)	29TPE1780	750	5
A71	Serra do Açor (Mata da Margaraça)	29TNE9252	550	5
A72	Vale do Vouga (Paradela)	29TNF5406	80	5
A73	Serra do Marão (junto ao ribeiro da Póvoa)	29TNF9065	800	5

2.2. Extração do DNA total

O DNA total foi extraído a partir de folhas e gomos de *Quercus robur*. A colheita fez-se utilizando tecidos jovens uma vez que a idade do tecido tem influência na quantidade de polissacarídeos e de compostos fenólicos, que interferem negativamente com o processo de extração, bem como com a qualidade de DNA obtido. Este facto é especialmente importante em *Q. robur*, que apresenta elevado conteúdo em diferentes tipos de metabolitos secundários.

No processo de extração utilizou-se o *DNeasy Plant Mini Kit* da QIAGEN™ e seguiram-se as instruções do fabricante.

Em alguns casos foi utilizado um protocolo de extração de DNA adaptado de Doyle & Doyle (1990), cujo procedimento se descreve em seguida:

1. No caso de serem utilizados gomos, remover os primórdios foliares de cinco deles; no caso de serem utilizadas folhas, cortar 2-3 cm² de folhas preferencialmente frescas e jovens em pequenos pedaços, evitando as nervuras.
2. Para 5 amostras, misturar 6 ml do tampão de extração [ATMAB (brometo de alquiltrimetilamónio) 2% (p/v); EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) 0,5 M, pH=8; Tris (hidroximetilaminometano)-HCl 1 M, pH=8; NaCl 4 M; PVP (polivinilpirrolidona) solúvel 1% (p/v)], previamente aquecido a 65°C, com 12 µL de mercaptoetanol.
3. Reduzir o material foliar a pó, num almofariz, em azoto líquido.
4. Transferir este pó para um tubo *Eppendorf*, adicionar 900 µL de tampão de extração e misturar bem. Incubar o material neste meio (durante 1 h a 55°C) com agitação suave e ocasional. Retirar o tubo *Eppendorf* do banho e esperar 10 min até que arrefeça.
5. Adicionar 400 µL de diclorometano e misturar suavemente até se formar uma emulsão. Centrifugar 10 min a 13000 rpm (4°C). Pipetar a fase superior (evitar pipetar a interfase) e removê-la para outro tubo *Eppendorf*. Se a fase superior não estiver limpa, repetir esta sequência.
6. Adicionar 400 µL (2/3 do volume pipetado anteriormente) de isopropanol frio e misturar de modo a provocar a precipitação dos ácidos nucleicos. Deixar precipitar pelo menos 1 h a -20°C. Centrifugar 10 min a 13000 rpm. Remover o sobrenadante, invertendo o tubo com cuidado para não se soltar a *pellet*. Secar os tubos deixando-os 5 min invertidos em papel absorvente.
7. Adicionar 1 ml de etanol 76%, agitar no *vortex* e centrifugar 10 min a 13000 rpm (4°C). Remover o sobrenadante cuidadosamente e deixar secar à temperatura ambiente.

8. Por fim, suspender os ácidos nucleicos em 100 µL de água ultra pura.

2.2.1 Determinação da produtividade da reacção de extracção e da pureza do DNA obtido

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas pela medição da absorvância a 260 nm (A_{260}) e a 280 nm (A_{280}) num espectrofotómetro. As leituras da absorvância devem cair entre os valores 0,1 e 1,0 e a diluição da amostra ajustada. O valor de absorvância 1,0, a 260 nm, corresponde a 50 µg de DNA por mL ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/mL}$).

A pureza do DNA é determinada pelo cálculo da razão entre a absorvância a 260 nm e a absorvância a 280 nm. Aceita-se geralmente que o DNA puro tem uma razão A_{260}/A_{280} igual a 1. Nalguns manuais, a ausência de qualquer impureza é dada por uma razão A_{260}/A_{280} superior (Sambrook 2001).

Alternativamente, a presença e concentração de DNA foram determinadas em gel de agarose 0,8%. A detecção do DNA foi feita com brometo de etídio e a sua concentração foi estimada por comparação com o marcador SM0393 Fermentas™.

Electroforese em gel de agarose

O gel de agarose obtém-se por solidificação da agarose (0,8-1,4%) fundida em tampão TAE 1x, TBE 1x ou TBE 0,5x ao qual se adiciona, depois de arrefecido, brometo de etídio na concentração final no gel de 0,8%. Previamente à aplicação no gel, adicionou-se às amostras tampão de amostra (50% de glicerol; 0,1% de azul de bromofenol e 100 mM EDTA) que facilita a aplicação e visualização destas. Após a corrida, o gel foi visualizado com radiação UV e fotografado com o sistema de captação de imagem Kodak™EDAS 290.

2.3 Reacção de amplificação

As amplificações foram efectuadas utilizando tubos de PCR de 20 µL num termociclador T3 Thermocycler da Biometra™. As temperaturas de hibridação dos *primers*, escolhidas para o estabelecimento do programa de amplificação, foram determinadas com base na literatura (Demasure *et al.*, 1995; Taberlet *et al.*, 1991), nalguns casos com ajustamentos.

2.3.1 *Primers* utilizados

O DNA extraído foi usado como molde em reacções de PCR que envolvem um conjunto de *primers* universais homólogos às regiões codificantes mais conservadas do cpDNA e que permitem a amplificação de regiões não codificantes mais variáveis. Neste estudo, foram usados três pares de *primers* (MWG-Biotech AGTM) para caracterizar todas as populações de *Q. robur*: TF (*primers* localizados nas regiões *trnT* e *trnF* e que amplificam a região *trnL*), DT (localizados nas regiões *trnD* e *trnT*) e CD (localizados nas regiões *trnC* e *trnD*) (figura 3). O primeiro par de *primers* (TF) foi descrito por Taberlet *et al.* (1991); os outros dois pares de *primers* (DT e CD) foram descritos por Demesure *et al.* (1995). A sua escolha baseou-se no facto de distinguirem numerosos haplótipos em populações de carvalhos nos trabalhos de Dumolin-Lapègue *et al.* (1997) e de Petit *et al.* (2002 b). Para mais informação acerca dos pares de *primers* utilizados consultar a tabela 2.

Variabilidade genética de *Quercus robur* L. em Portugal

Tabela 2: Detalhes sobre os *primers*, enzimas de restrição e condições e amplificação.

Gene	Pares de <i>primers</i> e suas sequências (5'→3')	Código	Tamanho (bp)*	Temperatura de emparelhamento (°C)	Duração da extensão (min)	Endonuclease	Referência
<i>trnC</i>	CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC	CD	3169	58	4	<i>Taq</i> I	Demesure <i>et al.</i> (1995)
<i>trnD</i>	GGG ATT GTA GTT CAA TTG GT						
<i>trnD</i>	ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC	DT	1213	54,5	2	<i>Taq</i> I	Demesure <i>et al.</i> (1995)
<i>trnT</i>	CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG						
<i>trnT</i>	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT	TF	1754	57,5	2	<i>Hinf</i> I	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
<i>trnF</i>	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG						

* Tamanho esperado do segmento amplificado (Dumolin-Lapègue, 1997 b)..

2.3.2 Reacção de amplificação

As condições de amplificação seguidas foram as de um protocolo otimizado no laboratório Forest Genetics do INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) – Cestas, França, as quais são indicadas nas tabelas seguintes (tabelas 3, 4 e 5):

Tabela 3: Resumo da composição básica do Tampão 2x para um volume final de 1000 μL . * EurogentecTM, ** FermentasTM.

Reagente	Concentração stock	Concentração final	Volume
Água ultra pura			688 μL
Tampão de Enzima*	10x	2x	200 μL
Mistura de nucleotídeos**	10 mM	0,2 mM	20 μL
MgCl ₂ *	50 mM	3,6 mM	72 μL
BSA**	20 ng/ μL	0,4 μM	20 μL

Preparou-se previamente tampão 2x, em alternativa à preparação da mistura total da reacção de PCR, uma vez que se mostrou ser uma solução estável que suporta armazenamento a -20°C, podendo ser utilizada posteriormente.

Tabela 4: Resumo da composição básica das reacções de PCR com a enzima *SilverStar* (EurogentecTM) para um volume final de 25 μL .

Reagente	Concentração stock	Concentração final	Volume
Água ultra pura			Completar até 25 μL
Tampão 2x	2x	1x	12,5 μL
Primer 5'	10 μM	0,2 μM	0,5 μL
Primer 3'	10 μM	0,2 μM	0,5 μL
DNA polimerase	5U/ μL	0,01 U/ μL	0,05 μL
DNA-molde		2 a 10 ng/ μL	5 μL

Para qualquer das reacções, a temperatura de hibridação e o tempo de extensão utilizados eram adequados aos *primers* da reacção utilizados e o número de ciclos à quantidade de produto que se desejava. Em todas as experiências foi preparado também um controlo negativo. A sequência de ciclos está generalizada na tabela 5:

Tabela 5: Programa geral para as reacções de amplificação.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
1x	94°C	4 minutos
	94°C	45 segundos
30 a 35x	54,5°C; 57,5°C; ou 58°C	45 segundos
	72°C	2 ou 4 minutos
1x	72°C	10 minutos
1x	4°C	manter

Para se verificar o sucesso da reacção de PCR, os produtos amplificados correram em gel de agarose 1,4% (p/v) em TBE 0,5x. Após a corrida, o gel foi visualizado com radiação UV e fotografado com o sistema de captação de imagem Kodak™EDAS 290.

Os produtos amplificados foram usados imediatamente ou armazenados a 4°C.

2.4 Digestão enzimática dos produtos de PCR

Cinco microlitros de cada produto amplificado foram digeridos em reacções de 20 µL com 5 U de uma das duas endonucleases de restrição: *TaqI* ou *HinI*. A temperatura de incubação dependeu da temperatura óptima da actividade de cada enzima. Os fragmentos amplificados DT e CD foram digeridos com a *TaqI* (Fermentas™), a 65°C durante 3 horas e os fragmentos amplificados TF com *HinI* (Fermentas™), a 37°C *overnight*. As condições da reacção seguiram as instruções do fabricante.

Os produtos digeridos foram usados de imediato ou armazenados a 4°C.

2.5 Separação dos produtos de restrição

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida nativo 8%, com espessura de 1,5 mm, obtido pela polimerização de 7,5 mL de solução comercial de poliacrilamida a 40% (37,5 acrilamida:1 bisacrilamida) (Merck™) com 3,75 mL de TBE 10x, 180 µL de PSA 10%, 30 µL de TEMED e 26,25 mL de água. Previamente à aplicação no gel, adicionou-se a 30 µL da amostra 3 µL de tampão de amostra (50% de glicerol; 0,1% de azul de bromofenol e 100 mM EDTA). O gel de poliacrilamida nativo 8% foi sujeito a um campo eléctrico de 300 V durante 3-4 horas, numa unidade vertical Hoefer™ SE 600. O gel foi preparado sem brometo de etídio, pois este impede a polimerização da acrilamida (Sambrook, 2001). Para facilitar a identificação dos diferentes haplótipos foram utilizados dois marcadores: SM0403 (Fermentas™) e SM0371 (Fermentas™). Uma vez finalizada a

electroforese, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL durante 10 minutos e os resultados visualizados com radiação UV e fotografados com o sistema de captação de imagem Kodak™EDAS 290.

2.6 Análise da diversidade genética

Para calcular as medidas de diversidade e de diferenciação genética [diversidade média intrapopulacional (h_S); diversidade total (h_T); e a razão $G_{ST} = (h_T - h_S) / h_S$ (coeficiente de diferenciação)] foram usadas as frequências dos haplótipos bem como as distâncias entre eles (número de fragmentos de restrição diferentes) de acordo com o método de Pons & Petit (1996) e Petit *et al.* (2002 a). Os cálculos foram feitos no programa HAPLODIV (Pons & Petit, 1996), disponível em <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software>. Na análise, foram apenas consideradas as populações com pelo menos três indivíduos amostrados.

As medidas de diversidade, bem como os erros padrão de cada uma, podem ser calculadas tendo em conta a distância entre os haplótipos (no caso de ν) ou ignorando a distância genética (no caso de h). O parâmetro de diversidade ν é definido da seguinte forma:

$$\nu = \sum_{ij} \pi_{ij} \chi_i \chi_j$$

onde π_{ij} representa a distância entre os haplótipos i e j , e χ_i e χ_j são as respectivas frequências observadas. Quando todas as distâncias π_{ij} são iguais a 1, ν torna-se idêntico à clássica medida de diversidade h (probabilidade de dois haplótipos serem diferentes quando tirados ao acaso de uma mesma população). Os coeficientes de diferenciação resultantes são designados de N_{ST} (quando baseado em ν) e de G_{ST} (quando baseado em h), e podem ser directamente comparados (Burban *et al.*, 1999).

Comment [b1]: Variância.

3. RESULTADOS

3.1 Polimorfismos do cpDNA

Neste estudo, foram detectados cinco haplótipos com base na informação fornecida pelos três fragmentos de PCR analisados. A denominação atribuída a estes haplótipos seguiu a nomenclatura definida por Petit *et al.* (2002 a). No anexo 1 é possível observar-se os perfis electroforéticos de cada haplótipo, a partir dos quais a identificação foi feita. Das três regiões estudadas, a DT foi a que mais polimorfismos (padrões de fragmentos de restrição diferentes) detectou (3), seguida pela região TF (2). A região CD, aparentemente, não apresenta nenhum polimorfismo (figuras 2, 3 e 4).

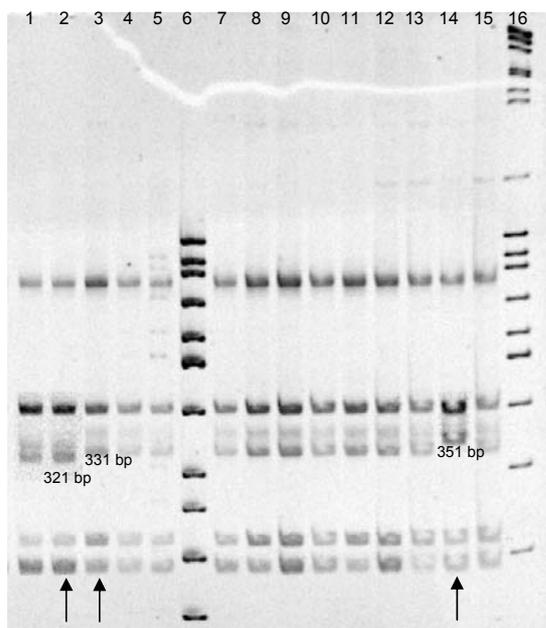


Figura 2: Gel de poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídeo, representando uma electroforese dos fragmentos de restrição resultantes da digestão do fragmento DT. Pista 6 e pista 16 – marcador de pesos moleculares. Notar a diferença de tamanho que o terceiro fragmento apresenta, por exemplo, entre o indivíduo da pista 2 (padrão B), da pista 3 (padrão A) e da pista 14 (padrão C).

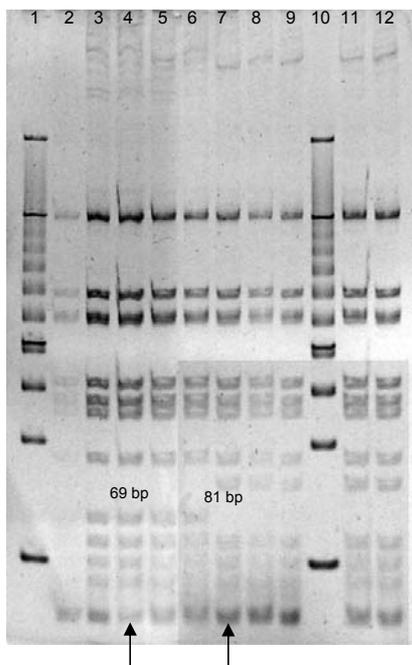


Figura 3: Gel de poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídeo, representando uma electroforese dos fragmentos de restrição resultantes da digestão do fragmento TF. Pista 1 e pista 10 – marcador de pesos moleculares. Notar a diferença de tamanho que o oitavo fragmento apresenta, por exemplo, entre o indivíduo da pista 4 (padrão 1) e o da pista 7 (padrão 2).

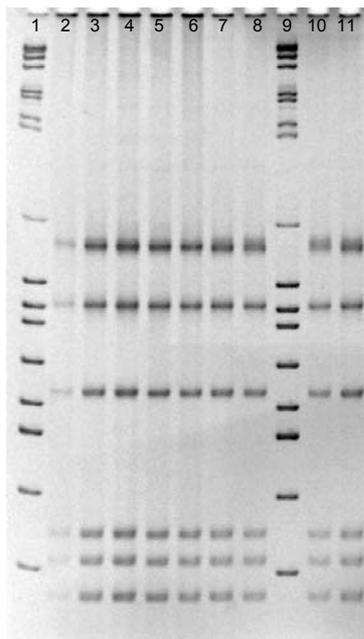


Figura 4: Gel de poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídeo, representando uma electroforese dos fragmentos de restrição resultantes da digestão do fragmento CD. Pista 1 e pista 9 – marcador de pesos moleculares.

No caso do fragmento DT, o padrão mais comum é o padrão A (com uma frequência de 72%), seguido do padrão B (com uma frequência de 23%), e por último, o padrão C (com uma frequência de 5%) (figura 5). No caso do fragmento TF, o padrão mais comum é o padrão 1 (com uma frequência de 84%), seguindo-se o padrão 2 (com uma frequência de 16%) (figura 6). Em ambos os casos, as populações são bastante homogéneas, não sendo frequente a presença de mais do que um padrão em cada população. Da combinação feita entre os diferentes padrões dos fragmentos obtidos, obtêm-se os seguintes haplótipos: H10/24, H11, H12, H25 e H32 (tabela 6). O nome atribuído ao haplótipo H10/24 deve-se ao facto de não ser possível fazer a distinção entre o haplótipo 10 e o haplótipo 24 com base em apenas estes três fragmentos estudados. Nos trabalhos de Olalde *et al.* (2002) e Petit *et al.* (2002 a) é analisada uma quarta região do cpDNA, a região *psaA/trnS* (AS), sendo esta região a que permite distinguir os dois haplótipos. Todos os cinco haplótipos pertencem à mesma linhagem, a linhagem B (Petit *et al.*, 2002 a). Os seus constituintes, bem como a relação filogenética entre os respectivos haplótipos é indicada nas figuras 8 e 9.

Tabela 6: Frequência relativa de cada haplótipo detectado para *Q. robur* em Portugal.

Haplótipos					Número de indivíduos	Número de populações	Populações polimórficas
H10/24	H11	H12	H25	H32			
110	29	44	9	1	193	39	5
57%	15%	22,8%	4,7%	0,5%			12,8%

3.2 Distribuição geográfica dos haplótipos

A maior parte destas populações autóctones de *Q. robur* são monomórficas, isto é, compostas por apenas um haplótipo, e apenas 12,8% são polimórficas (tabela 6). As populações polimórficas localizam-se sobretudo na região entre o rio Douro e o rio Mondego.

O haplótipo mais comum é o haplótipo 10/24 (presente em 57% das amostras) e ocorre em toda a área de distribuição de *Q. robur*, predominando a norte do rio Douro. A sul do rio Mondego está presente em apenas uma população (Serra do Açor). Em grande parte das populações é um haplótipo fixo (figura 9).

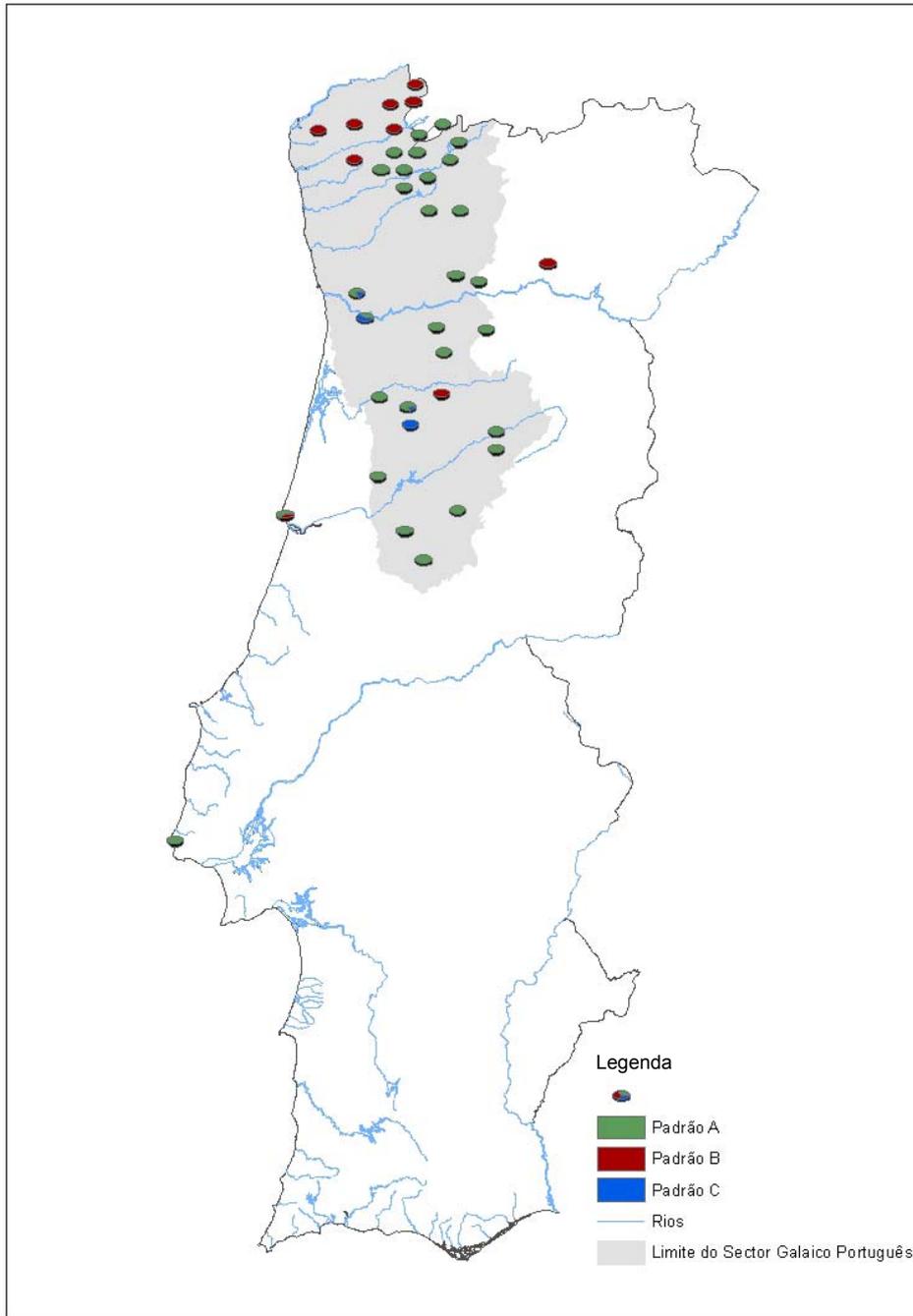


Figura 5: Distribuição dos padrões A, B e C referentes ao fragmento DT em *Q. robur*.

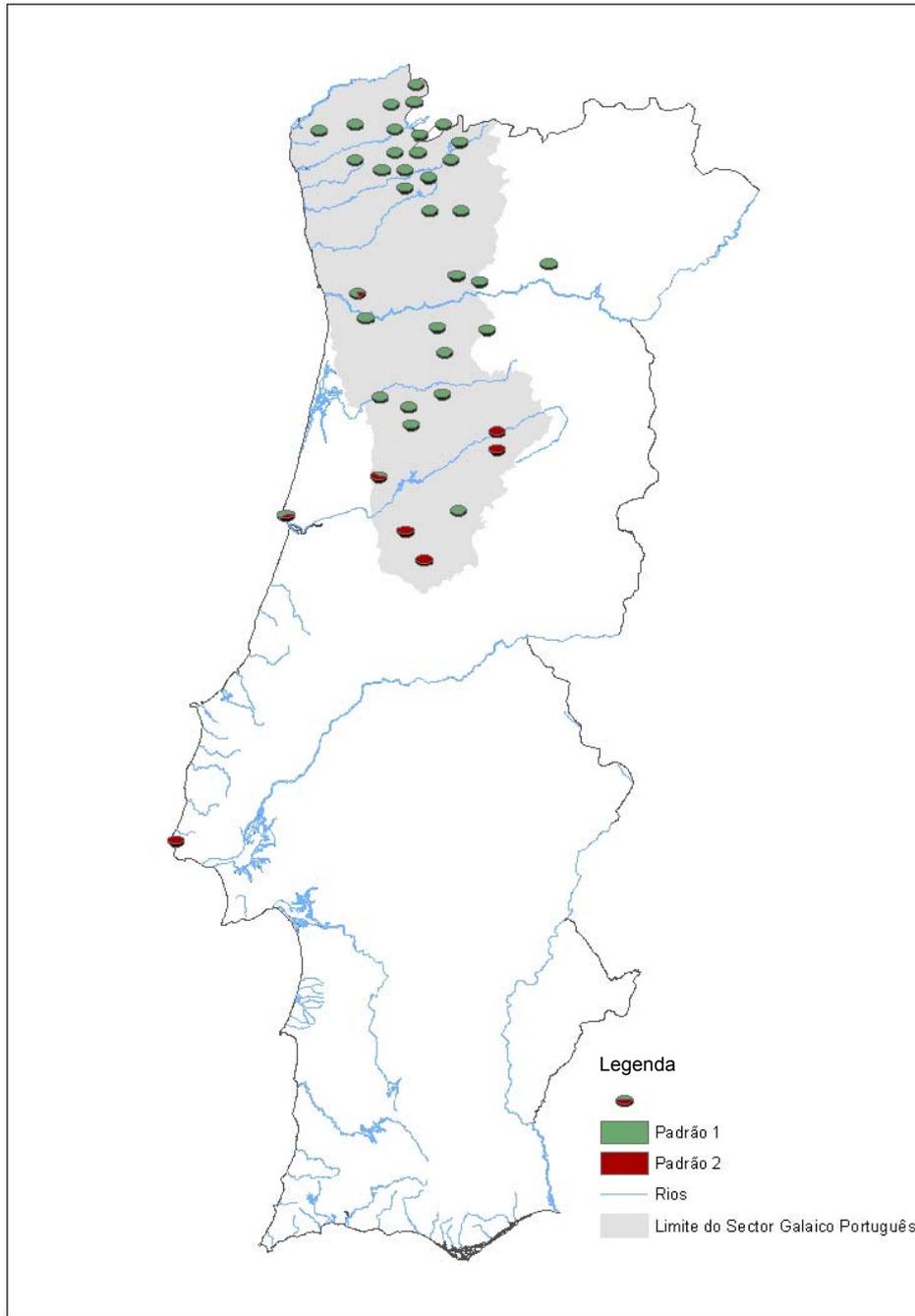


Figura 6: Distribuição dos padrões 1 e 2 referentes ao fragmento TF em *Q. robur*.

O haplótipo 12 está representado em 22,8% dos indivíduos amostrados. Está sobretudo presente no Noroeste de Portugal. Surge também na amostra A68, em Bodiosa a Velha, no concelho de Viseu, e em duas populações localizadas fora da área de distribuição contínua de *Q. robur*, na amostra A34 (representado por apenas um indivíduo), na Serra da Boa Viagem, e na amostra A65, em Amieiro, onde é fixo na população.

O haplótipo 11, com uma frequência de 15%, está apenas presente no limite sul da área de distribuição da espécie e em duas populações fora desta área: na população da Serra da Boa Viagem (A34) e na população da Serra de Sintra (A45).

Em apenas três populações (correspondente a menos de 5% dos indivíduos amostrados) surge o haplótipo 25. Está presente na população de Porto Carvoeiro (A63) e em duas localidades da serra do Caramulo, Rua (A29) e Pinoucas (A30).

Por último, surge o haplótipo 32, com uma frequência de 0,5%, e com uma localização muito restrita, aparecendo apenas na Serra de Valongo (A28) e estando apenas representado por um indivíduo. Este haplótipo já tinha sido descrito para a Península Ibérica no trabalho de Olalde *et al.* (2002) em dois indivíduos de *Quercus petraea*, e é agora descrito pela primeira vez em Portugal e em *Q. robur*.

3.3 Análise da diversidade e da diferenciação do cpDNA

A diversidade do cpDNA bem como a sua repartição entre as populações foram estudadas e comparadas para a totalidade da amostragem. Os parâmetros de diversidade e de diferenciação genética foram estimados de acordo com Pons & Petit (1995) e estão apresentados na tabela 7. Uma vez que todas as amostras de *Q. robur* possuem haplótipos idênticos, ou seja, igualmente relacionados (mesmo número médio de fragmentos de restrição polimórficos entre dois haplótipos seleccionados ao acaso na população total) e pertencem à mesma linhagem (Petit *et al.*, 2002 a), os parâmetros estatísticos que têm em conta a distância genética (ν_S , ν_T e N_{ST}) não foram considerados. A diversidade total (h_T) é de 0,616 e a diversidade intrapopulacional (h_S) apresenta um valor bastante baixo, 0,064.

Tabela 7: Níveis de diversidade e diferenciação genética do cpDNA para todas as populações portuguesas de *Q. robur* amostradas. Erros padrão em parênteses.

Nº de populações (≥ 3 indivíduos)	Média harmónica de indivíduos por população	Nº de haplótipos	h_s	h_T	G_{ST}
39	4,92	5	0,064 (0,0281)	0,616 (0,0581)	0,896 (0,0459)

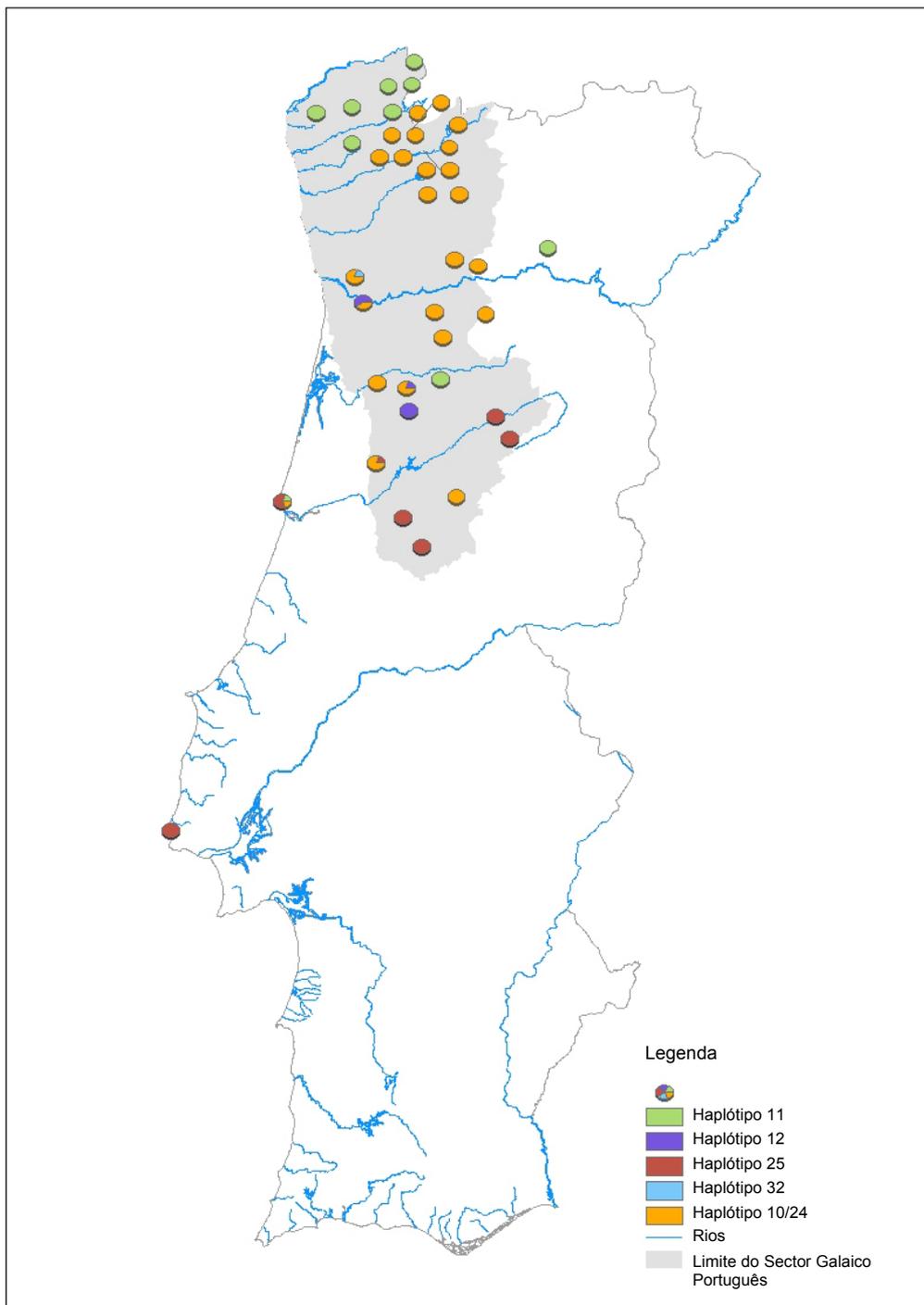


Figura 7: Distribuição dos haplótipos encontrados para *Quercus robur*.

O nível de subdivisão populacional é bastante elevado, sendo este expresso pelo valor do coeficiente de diferenciação $G_{ST} = 0,896$, o que significa que a maior parte da diversidade do cpDNA está distribuída pelas várias populações.

5. Discussão

De uma forma geral, esta análise populacional confirma grande parte dos resultados já discutidos em trabalhos anteriores (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Olalde *et al.*, 2002 e Petit *et al.*, 2002 a, b). Contudo, neste estudo, foi abrangida uma área muito mais significativa do território português, em contraste com as oito amostragens portuguesas de *Q. robur* realizadas por Olalde *et al.* (2002).

Apenas cinco haplótipos diferentes foram descritos para *Q. robur*, uma vez que o haplótipo 10 e o haplótipo 24 não foram diferenciados, embora ambos já tenham sido descritos em Portugal por Olalde *et al.* (2002).

Com base na variação do cpDNA podem-se distinguir três regiões principais em Portugal: Norte de Portugal até ao rio Douro; região compreendida entre o rio Douro e o rio Mondego; região a Sul do rio Mondego.

O haplótipo mais comum é o haplótipo 10/24 (presente em 57% das amostras) e ocorre em toda a área de distribuição de *Q. robur*, predominando a norte do rio Douro. Não foi possível distinguir em que proporções os haplótipos 10 e 24 estão distribuídos pela totalidade dos indivíduos amostrados, mas H10 deverá ser o mais comum, visto que é o haplótipo mais abundante da linhagem B e na Península Ibérica (Olalde *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002 b).

O haplótipo 12 está representado em 22,8% dos indivíduos amostrados e está sobretudo presente no Noroeste de Portugal. À semelhança de resultados anteriormente obtidos para a Península Ibérica, é o segundo haplótipo cloroplastidial mais frequente.

O haplótipo 11, com uma frequência de 15%, está apenas presente no limite sul da área de distribuição da espécie e em duas populações fora desta área: na população da Serra da Boa Viagem (A34) e na população da Serra de Sintra (A45). É o haplótipo mais comum nas populações do sul e é descrito pela primeira vez em Portugal. Em Espanha, surge tanto no extremo norte como no extremo sul do país (Olalde *et al.*, 2002), tendo uma distribuição muito fragmentada, como já se verificou noutros locais, nomeadamente em França (Petit *et al.*, 2002 d). O facto de este haplótipo não ter sido descrito para Portugal anteriormente, pode estar relacionado com o seu tipo de distribuição. Apresentando-se restrito a pequenas áreas e de uma forma descontínua é fácil que não tenha sido amostrado até agora. Neste trabalho, o esforço de amostragem foi grande e abarcou quase toda a área de distribuição de *Q. robur* em Portugal.

Quanto ao haplótipo 25; presente em três populações, foi apenas localizado na região compreendida entre o rio Mondego e o rio Douro. Contudo, Olalde *et al.*, (2002) tinha já o identificado numa única população portuguesa, no norte do país.

Foi pela primeira vez demonstrada a presença do haplótipo 32 em *Q. robur* e em Portugal, tendo sido encontrado na Serra de Valongo e em apenas um indivíduo. Este haplótipo é bastante raro, anteriormente descrito apenas para dois indivíduos de *Q. petrea*, no norte de Espanha, na região de León (Olalde *et al.*, 2002). Este haplótipo está relacionado com um dos haplótipos mais abundantes da Península Ibérica, o haplótipo 11 (Petit *et al.*, 2002 b).

No que diz respeito aos níveis de diversidade genética, pode-se dizer que o valor da diversidade intrapopulacional (h_s) é muito baixo (0,064), isto porque a maioria das populações é fixa para um haplótipo, existindo apenas uma população com três haplótipos presentes e quatro populações com dois haplótipos. A diversidade total (h_T) apresenta um valor de 0,616, que pode ser considerado bastante elevado tendo em conta que apenas foi estudada uma espécie. Resultados obtidos para a Península Ibérica, em que foram consideradas as seis espécies de carvalhos caducifólios e marcescentes naturais desta região [*Quercus robur* L., *Quercus petrea* (Matt.) Liebl., *Quercus pyrenaica* Willd., *Quercus canariensis* Willd., *Quercus pubescens* Willd. e *Quercus faginea* Lam.] e catorze haplótipos cloroplastidiais foram distinguidos, os valores de h_s e h_T são respectivamente 0,082 e 0,804 (Olalde *et al.*, 2002). E a diversidade genética por áreas geográficas? Será que é menor para Norte do Mondego indicando bottleneck ou recolonização recente, tal como na salamandra?

O nível de subdivisão populacional é bastante elevado, sendo este expresso pelo valor do coeficiente de diferenciação $G_{ST} = 0,896$, o que significa que a maior parte da diversidade do cpDNA está distribuída pelas várias populações. O coeficiente de diferenciação genética é bastante elevado para os carvalhos europeus (0,828), sendo os valores mais elevados descritos na Península Ibérica (0,889) e em Itália (0,879) (Petit *et al.*, 2002 a). Esta forte estruturação genética pode ser explicada, por exemplo, pelo facto de o fluxo efectivo de genes para um genoma que é apenas herdado matematicamente estar limitado exclusivamente às sementes e ainda pelo facto de em espécies hermafroditas, como é o caso das espécies de carvalho, o padrão de floração e de frutificação resultar num número efectivo de árvores que contribuem para a geração seguinte como fêmeas que é muito inferior ao número efectivo de árvores que actuam como machos (Demesure *et al.*, 1997).

Uma vez que não foi identificado nenhum haplótipo novo em relação aos haplótipos já definidos em trabalhos anteriores (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Olalde *et al.*, 2002 e Petit *et al.*, 2002 a), e tendo as relações filogenéticas dos mesmos haplótipos já sido estudadas, esta análise não foi feita. Contudo, esta informação é fornecida através das figuras 7 e 8 (Petit *et al.*, 2002 a) As árvores filogenéticas apresentadas foram obtidas a partir do programa PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1993). Como medida de distância genética utilizou-se o número de fragmentos de restrição polimórficos obtido para cada haplótipo. Cada fragmento de restrição polimórfico é um carácter e os diferentes tamanhos possíveis para o mesmo

fragmento são os estados de carácter. A nomenclatura seguida foi a de Dumolin-Lapègue *et al.* (1997): cada variação de comprimento para um fragmento polimórfico é anotada com um algarismo de 1 a 6, de acordo com a sua migração no gel: de 1 para 6, em que 6 corresponde à maior distância percorrida ao longo do gel, ou com o algarismo 9, que representa mutações pontuais (anexo 2).

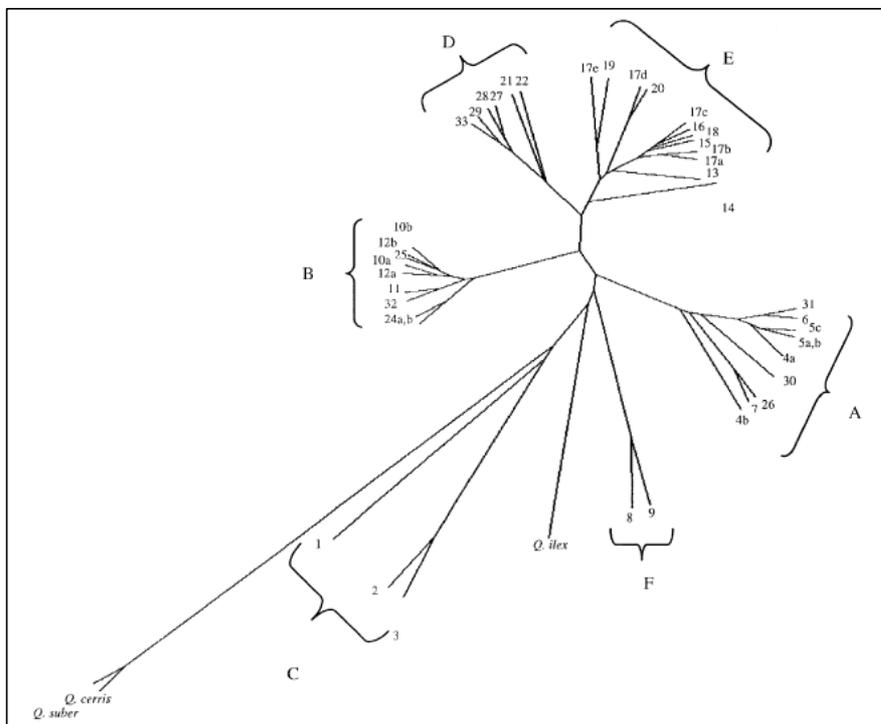


Figura 8: Árvore filogenética dos 45 haplótipos cloroplastidiais obtida a partir do algoritmo Fitch. Estão representados os 42 haplótipos identificados no complexo ROBUR, os haplótipos correspondentes a cada uma das espécies *outgroup* (*Quercus ilex*, *Quercus suber* e *Quercus cerris*) e as seis linhagens definidas (A-F) em Petit *et al.* (2002 a). Figura modificada a partir de Petit *et al.* (2002 a).

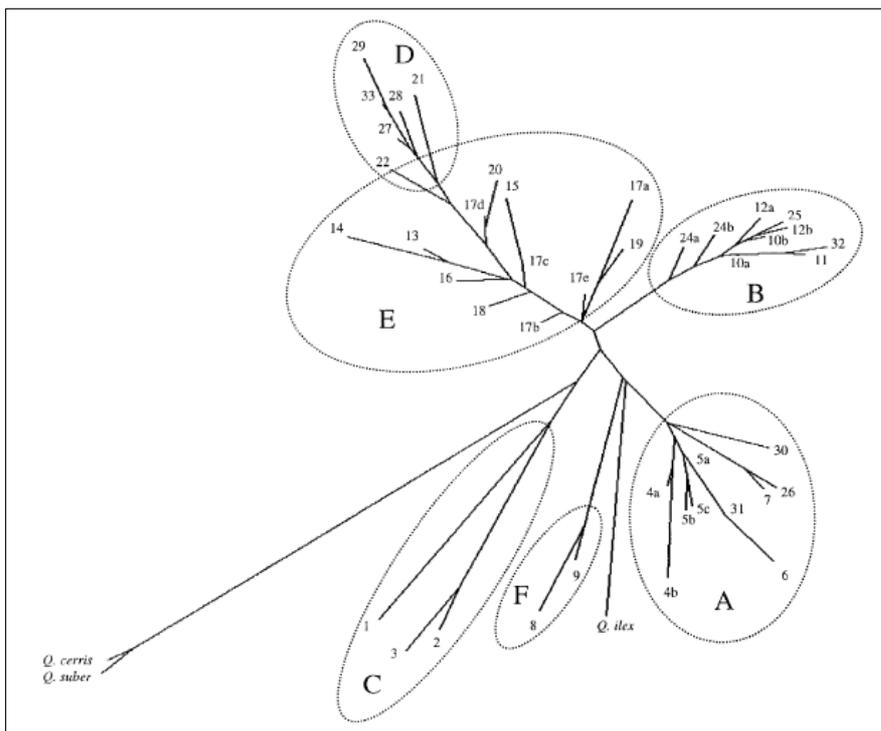


Figura 9: Árvore filogenética dos 45 haplótipos cloroplastidiais obtida a partir do algoritmo Kitsch. Legenda igual à da figura 7. Figura modificada a partir de Petit *et al.*, (2002 a).

Das seis linhagens cloroplastidiais até hoje reconhecidas na Europa, quatro estão presentes na Península Ibérica (A – D) (Olalde *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002 a) (figura 10). Nesta análise apenas foram encontrados haplótipos pertencentes à linhagem B. Tal resultado está em concordância com os trabalhos anteriormente referidos, em que apenas os haplótipos desta linhagem foram descritos para *Q. robur* na Península Ibérica e apenas a linhagem B está presente na parte oeste da península. Estes trabalhos referem que, apesar de haver sistematicamente partilha de haplótipos entre várias espécies do género *Quercus*, algumas destas espécies estão visivelmente mais relacionadas com determinadas linhagens, do que com outras.

A linhagem B é formada por três haplótipos abundantes (H10, H11, H12) e seis menos abundantes. Nestes últimos encontram-se os restantes haplótipos descritos para Portugal (H24, H25 e H32). A distribuição geográfica desta linhagem apoia a ideia de ter

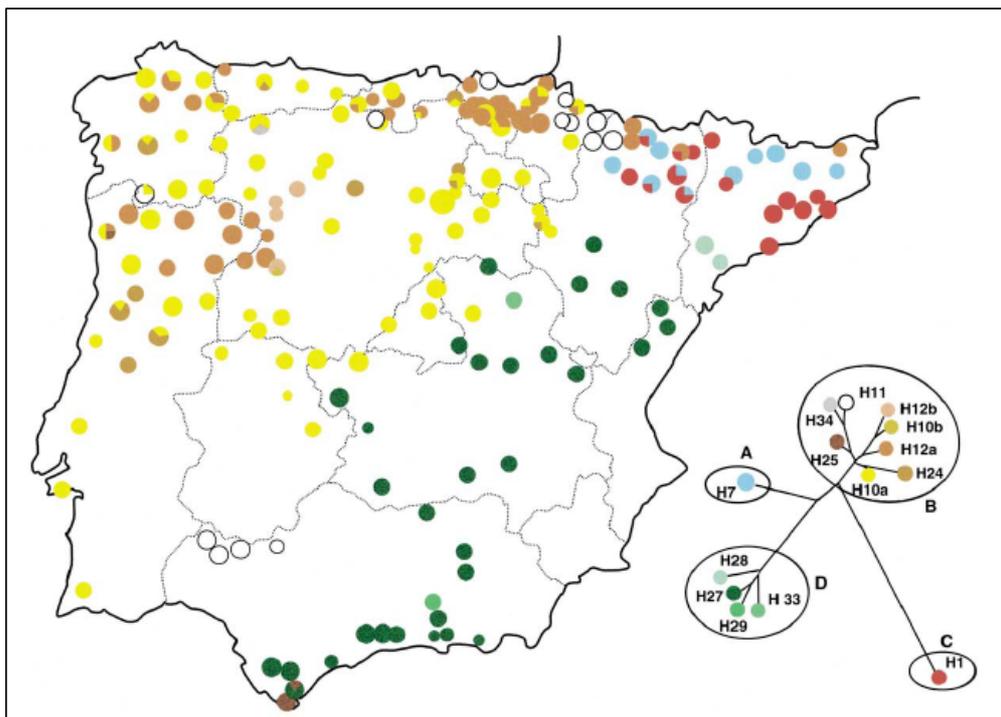


Figura 10: Distribuição geográfica dos 14 haplótipos cloroplastidiais descritos para os carvalhos caducifólios e marcescentes na Península Ibérica. A árvore Neighbour-Joining é fornecida não só para ajudar na interpretação dos haplótipos coloridos, como para indicar as diferentes linhagens maternas. Figura modificada a partir de Olalde *et al.* (2002).

existido um refúgio glacial na costa oeste da Península Ibérica (Olalde *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002 a). A partir deste refúgio, um subconjunto de haplótipos terá migrado pela Europa, seguindo a costa Atlântica, para Norte, até às costas do mar do Norte (Cottrell *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002 b). O movimento destes haplótipos acima dos Pirinéus parece ter ocorrido através do país Basco (Petit *et al.*, 2002 b).

O haplótipo 10, o mais abundante da linhagem B, ocorre desde o sul de Portugal e grande parte do oeste de Espanha (Olalde *et al.*, 2002) a França (Petit *et al.*, 2002 d), Grã-Bretanha (Cottrell *et al.*, 2002), Bélgica, Holanda, noroeste da Alemanha (König *et al.*, 2002), e partes da Escandinávia (Jensen *et al.*, 2002).

A distribuição do haplótipo 12 está localizada ligeiramente mais a oeste que a do haplótipo 10, uma vez que H12 é particularmente abundante na Galiza, na Cordilheira Cantábrica (Olalde *et al.*, 2002) e na parte oeste de França (Petit *et al.*, 2002 d). No trabalho de Olalde *et al.* (2002), H12 foi apenas localizado a norte do rio Douro e Petit *et al.* (2002 b) refere que a ausência de árvores com este haplótipo a sul do mesmo rio, sugere que o

refúgio Pleistocénico deste haplótipo poderá ter estado localizado a latitudes muito superiores do que as estimadas para a distribuição dos carvalhos durante este período (Brewer *et al.*, 2002). Contudo, neste trabalho, o haplótipo 12 surge também na região compreendida entre o rio Douro e o rio Mondego, em Bodiosa a Velha (amostra A68), e em duas populações localizadas fora da área de distribuição de *Q. robur*, na Serra da Boa Viagem (amostra A34), a localização mais a sul encontrada para este haplótipo, e em Amieiro (amostra A65), neste caso, ligeiramente a norte do rio Douro. Este resultado veio mostrar que ocorrem populações localizadas mais a sul do que o registado e que a sua ausência em regiões ainda mais meridionais pode dever-se a subamostragem ou a processos de destruição local do habitat e, portanto, não apoia a ideia acima referida.

O haplótipo 11 é menos comum que os haplótipos 10 e 12, tem uma distribuição muito fragmentada, sobretudo em França (Petit *et al.*, 2002 d) e na Grã Bretanha (Cottrell *et al.*, 2002).

No geral, estes três haplótipos apresentam distribuições muito similares, embora, a escalas regionais, as áreas de distribuição de cada um sejam, usualmente, mutuamente exclusivas (Petit *et al.*, 1997), facto que também se verifica nesta análise (figura 7).

Dentro dos variantes cloroplastidiais menos frequentes da linhagem B, está o haplótipo 25. Presente em apenas três populações portuguesas, é comum na parte sul da Andaluzia e na cordilheira do Atlas, em Marrocos. A sua repartição entre os continentes africano e europeu enfatiza a importância das trocas estabelecidas através do Estreito de Gibraltar. De facto, durante o último período glacial, o nível do mar era muito mais baixo e as duas linhas de costa estiveram em grande proximidade (Petit *et al.*, 2002 b). A região montanhosa do Atlas poderá ter constituído um refúgio a partir do qual seria possível um processo de recolonização.

O haplótipo 24, também de abundância intermédia, está restrito à Península Ibérica e a França (Olalde *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002 d). A rota de migração traçada para este haplótipo é semelhante à dos haplótipos 10, 11 e 12.

Por fim, o haplótipo 32, um dos haplótipos mais raros da linhagem B, foi até agora descrito em apenas duas populações (na Serra de Valongo e na região de Léon) e pensa-se que nunca terá migrado para fora da península (Petit *et al.*, 2002 b).

Os resultados obtidos nesta análise não apoiam claramente a hipótese de terem existido refúgios secundários (micro-refúgios) no Noroeste de Portugal (Brewer *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002 b): a diversidade genética é mais elevada a sul do rio Douro que a norte do mesmo e não há nenhum haplótipo que apenas esteja presente na região Norte, à excepção do haplótipo 32. Contudo, por ser um haplótipo muito raro e pouco se saber acerca da sua possível distribuição geográfica, não podem ser feitas inferências sobre possíveis refúgios para este haplótipo. Por outro lado, o facto do haplótipo 25 estar presente na região

compreendida entre o rio Douro e o rio Mondego, quando até agora só foi descrito para o extremo sul da Península Ibérica (na Andaluzia) e em Marrocos, não é facilmente entendido se não se considerar a hipótese da existência de pequenos refúgios a norte do rio Mondego, com microclimas particulares que tenham possibilitado a sobrevivência deste haplótipo durante os períodos glaciares. Dados semelhantes foram já obtidos para outros organismos com distribuições em áreas atlânticas, nomeadamente para anfíbios (*Chioglossa lusitanica*) (Alexandrino *et al.*, 2000) e para répteis (*Lacerta schreiberi*) (Paulo *et al.*, 2002). Olalde *et al.*, 2002 discute extensivamente a forte possibilidade de terem existido refúgios secundários a cima do paralelo 40° na Península Ibérica com base em informação palinológica e com base nos polimorfismos do cpDNA obtidos na sua análise. Dos catorze haplótipos encontrados na Península, nove estão ausentes abaixo do paralelo 40°. É possível que tenham ocorrido extinções em zonas mais a sul (Petit *et al.*, 2002 b), mas a extinção de tantos haplótipos ibéricos (65%) é uma hipótese pouco provável. Além disso, alguns haplótipos raros estão restritos a áreas que poderiam servir como refúgios acima do paralelo 40°. Mais exemplos poderiam ser dados, exemplos esses que fortalecem a hipótese de que a vegetação poderá também ter sobrevivido em vales de montanhas mais ou menos profundos e abrigados fora do sul da península durante o período glacial. Mudanças associadas à altitude, em vez da latitude, tiveram certamente um papel muito importante na história recente da vegetação ibérica.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Apesar dos elevados valores de diversidade cloroplastidial característicos desta região, há que se ter em consideração o risco de extinção de alguns haplótipos devido ao seu pequeno tamanho populacional. Quanto à possível existência de micro-refúgios no Noroeste de Portugal e à dinâmica intra-refúgio entre os mesmos, conclusões mais detalhadas necessitariam, senão de uma re-avaliação das áreas amostradas, da utilização de metodologias com maior grau de resolução.

A distribuição geográfica dos polimorfismos do cpDNA, juntamente com mapas de depósitos de pólen fóssil, têm permitido localizar zonas de refúgio e reconstituir as rotas de recolonização pós-glaciais de várias espécies do género *Quercus*. Uma vez que os carvalhos são espécies que servem de suporte nos ecossistemas florestais europeus, a identificação destas rotas poderá ter implicações futuras na distribuição e diversidade de outras espécies, animais e vegetais, associadas aos carvalhais. A informação acumulada no decorrer deste trabalho contribuirá para a validação de simulações da dinâmica migratória de *Quercus robur*, quando sujeita a variação climática.

Historicamente, várias espécies de carvalho têm sido vastamente disseminadas no continente europeu, embora se verifique que, actualmente, este fenómeno ocorre em menor escala. Na maior parte dos locais, o carvalhal presente é uma mistura de material nativo e exótico e, geralmente, é pouco frequente existirem arquivos que permitam identificar a origem de lotes de sementes. Quando se constroem mapas de haplótipos de cpDNA a partir de material de presumível origem natural, estes podem ser considerados como referência, permitindo que qualquer população de origem desconhecida possa ser identificada como nativa ou não. Esta informação poderá ser de extrema importância, por exemplo, para estudos ecológicos de populações em declínio, uma vez que a sensibilidade a doenças pode resultar da origem não-nativa de uma plantação. A regulamentação europeia recomenda o uso de material de reprodução de origem no repovoamento florestal, exactamente para evitar estes e outros problemas associados aos materiais introduzidos.

Tendo em conta a importância económica e ecológica das formações vegetais que as espécies de carvalho integram, será possível utilizar este conhecimento para: traçar a origem geográfica de lotes de sementes; identificar a fonte de plantação; confirmar a autoctonia da madeira de carvalho ou de florestas para conservação; traçar a origem de produtos de madeira; e conhecer o património genético que estas populações representam com o objectivo de conservação. Neste caso, o trabalho apresentado já contribui com informação bastante importante: identifica os haplótipos que estão presentes nas

populações portuguesas de *Q. robur*, caracteriza a forma como a diversidade genética está distribuída pelas várias populações e revela a necessidade de medidas de protecção principalmente para as populações representadas por haplótipos raros ou pouco frequentes. Realça, portanto, a importância de Portugal como área de elevada biodiversidade e como repositório de um património genético importante.

8. ANEXOS

Anexo 1. Padrões de restrição identificados com as seguintes combinações: DT-*TaqI*, TF-*HinfI* e CD-*TaqI*.

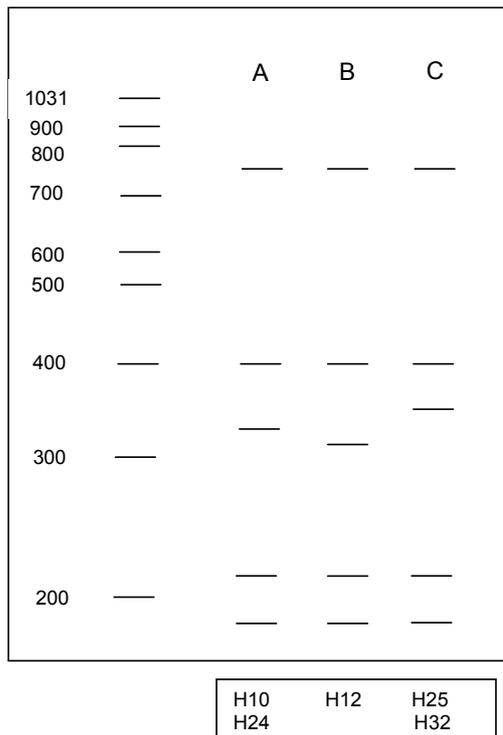


Figura 11: O marcador de pesos moleculares está indicado do lado esquerdo do diagrama, com o tamanho dos fragmentos em pares de bases. As outras linhas correspondem aos diferentes padrões de restrição obtidos com a combinação DT-*TaqI*. Um padrão pode corresponder a um ou vários haplótipos, sendo estes listados exactamente por baixo da linha correspondente.

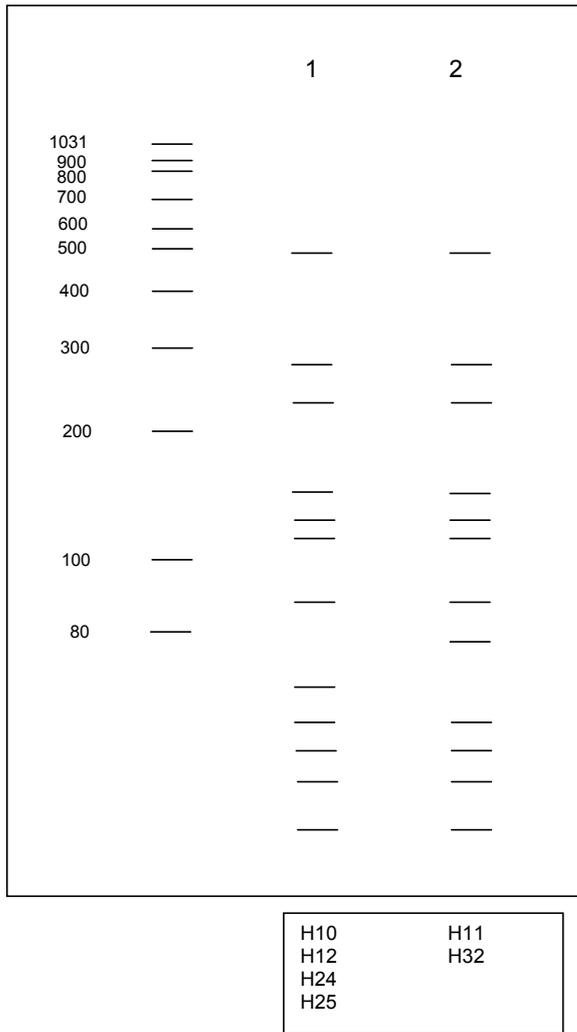


Figura 12: O marcador de pesos moleculares está indicado do lado esquerdo do diagrama, com o tamanho dos fragmentos em pares de bases. As outras linhas correspondem aos diferentes padrões de restrição obtidos com a combinação TF-*Hinf*I. Um padrão pode corresponder a um ou vários haplótipos, sendo estes listados exactamente por baixo da linha correspondente.

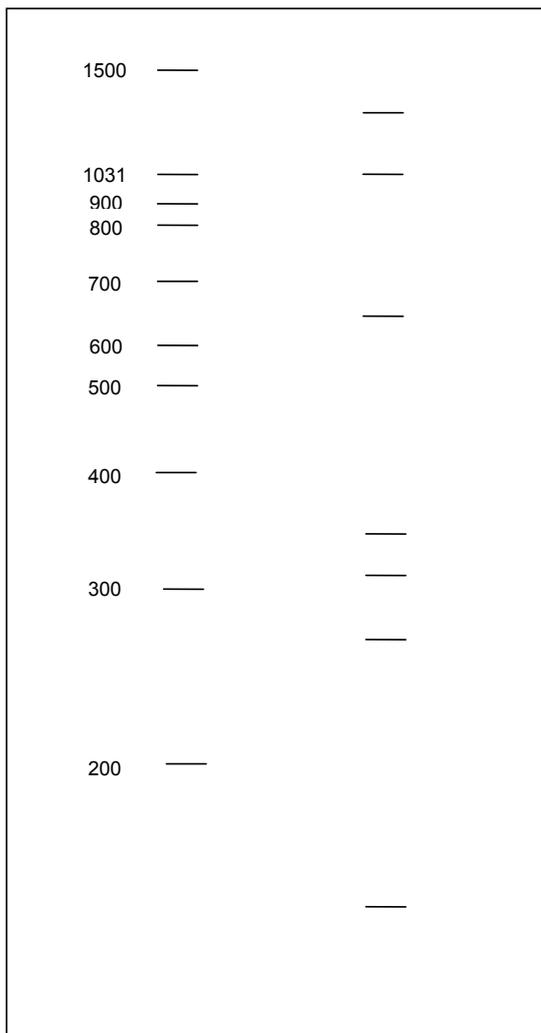


Figura 13: O marcador de pesos moleculares está indicado do lado esquerdo do diagrama, com o tamanho dos fragmentos em pares de bases. A outra linha corresponde ao padrão de restrição obtido com a combinação CD-*TaqI*. Neste caso, o mesmo padrão de restrição é partilhado por todos os haplótipos.

Anexo 2: Tabela com os 5 haplótipos detectados neste estudo. Para cada haplótipo, as variações de comprimento observadas em cada fragmento de restrição polimórfico são listadas (DT1: maior fragmento obtido com a combinação DT-*TaqI*), ordenadas de acordo com a sua migração no gel: de 1 para 6, em que 6 corresponde à maior distância percorrida ao longo do gel.

Haplótipo	Fragmento															
	DT1	DT2	DT3	DT4	CD1	CD2	CD3	CD4	CD6	TF1	TF3	TF5	TF10	TF11	TF12	TF14
10/24	1	2	3	1	1	1	2	3	1	2	0	2	0	2	1	2
11	1	2	3	1	1	1	2	3	1	2	0	2	0	1	1	2
12	1	2	4	1	1	1	2	3	1	2	0	2	0	2	1	2
25	1	2	2	1	1	1	2	3	1	2	0	2	0	2	1	2
32	1	2	2	1	1	1	2	3	1	2	0	2	0	1	1	2

9. BIBLIOGRAFIA

ALEXANDRINO, J., FROUFRE, E., ARNTZEN, J.W., FERRAND, N. (2000) – Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology* **9**: 771-781.

AVISE, J. C. (2000) – Phylogeography, The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, England.

BORDÁCS, S., POPESCU, F., SLADE, D., CSAIKL, U. M., LESUR, I., BOROVICS, A., KÉZDY, P., KÖNIG, A. O., GÖMÖRY, D., BREWER, S., BURG, K., PETIT, R. J. (2002) – Chloroplast DNA variation of white oaks in northern Balkans and in the Carpathian Basin. *Forest Ecology and Management* **156**: 197-209.

BREWER, S., CHEDDADI, R., BEAULIEU, J. L., REILLE, M. (2002) – The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management* **156**: 27-48.

BURBAN, C., PETIT, R. J. (2003) – Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Molecular Ecology* **12**:1487-1495.

BURBAN, C., PETIT, R. J., CARCREFF, E., JACTEL, H. (1999) – Range wide variation of the maritime pine bast scale *Matsucoccus feytaudi* Duc. (Homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. *Molecular Ecology* **8**: 1593-1602.

CARRIÓN, J. S., YLL, E. I., WALKER, M. J., LEGAZ, A. J., CHAÍN, C., LÓPEZ, A. (2003) – Glacial refugia of temperate, Mediterranean and Ibero-North African flora in south-eastern Spain: new evidence from cave pollen at two Neanderthal man sites. *Global Ecology & Biogeography* **12**: 119-129.

CASTRO, E. B., GONZÁLEZ, M. A. C., TENORIO, M. C., BOMBÍN, R. E., ANTÓN, M. G., FUSTER, M. G., MANZANEQUE, A. G., MANZANEQUE, F. G., SAIZ, J. C. M., JUARISTI, C. M., PAJARES, P. R., OLLERO, H. S. (2001) – Los bosques ibéricos, Una interpretación geobotánica. Editorial Planeta, Còrsega, España, pág.: 43-55.

CASTROVIEJO, S., AEDO, C., CAMPO, C., LAÍNIZ, M., MONTSERRAT, P., MORALES, GARMENDIA, F., FELINER, G., RICO, E., TALAVERA, S., VILLAR, L. (1986-2001) – Flora Ibérica – Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Real Jardim Botânico, CSIC.

COMES, H. P. (2004) – The Mediterranean region - a hotspot for plant biogeographic research. *New Phytologist* **164**: 11-14.

COMES, H. P., KADEREIT, J. W. (1998) – The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Elsevier Science* **3** (11): 432-438.

COTTRELL, J. E., MUNRO, R. C., TABBENER, H. E., GILLIES, A. C. M., FORREST, G. I., DEANS, J. D., LOWE, A. J. (2002) – Distribution of chloroplast DNA variation in British oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*): the influence of postglacial colonisation and human management. *Forest Ecology and Management* **156**: 181-195.

CSAIKL, U. M., BURG, K., FINESCHI, S., KÖNIG, A. O., MÁTYÁS, G., PETIT, R. J. (2002) – Chloroplast DNA variation of white oaks in the alpine region. *Forest Ecology and Management* **156**: 131-145

CSAIKL, U. M., GLAZ, I., BALIUCKAS, V., PETIT, R. J., JENSEN, J. S. (2002) – Chloroplast DNA variation of white oak in the Baltic countries and Poland. *Forest Ecology and Management* **156**: 211-222.

CSAIKL, U.M., BASTIAN, H., BRETTSCHEIDER, R., GAUCH, S., MEIR, A., SCHAUERTE, M., SCHOLZ, F., SPERISEN, C., VORNAM, B., ZIEGENHAGEN, B. (1998) – Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 69-86.

DEGUILLOUX, M.-F., DUMOLIN-LAPÈGUE, S., GIELLY, L., GRIVET, D., PETIT, R. J. (2003) – A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes* **3**: 24-27.

DEGUILLOUX, M.-F., PEMONGE, M.-H., BERTEL, L., KREMER, A., PETIT, R. J. (2003) – Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools. *Molecular Ecology*. **12**: 1629-1636.

DEGUILLOUX, M.-F., PEMONGE, M.-H., PETIT, R. J. (2002) – Novel perspectives in wood certification and forensics: dry as a source of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América* **269**: 1039-1046.

DEMASURE, B., SODZI, N., PETIT, R. J. (1995) – A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* **4**: 129-131.

DOYLE, J.J. & J.L. DOYLE (1990) – Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. (1987) – A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.

DUMINIL, J., PEMONGE, M.-H., PETIT, R. J. (2002) – A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes* **2**: 428-430.

DUMOLIN, S., DEMASURE, B., PETIT, R. J. (1995) – Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* **91**: 1253-1256.

DUMOLIN-LAPÈGUE, S., PEMONGE, M.-H., GIELLY, L., TABERLET, P., PETIT, R. J. (1999) – Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. *Molecular Ecology* **8**: 2137-2140.

DUMOLIN-LAPÈGUE, S., PEMONGE, M.-H., PETIT, R. J. (1998) – Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks. *Molecular Biology and Evolution* **15** (10): 1321-1331.

DUMOLIN-LAPÈGUE, S., DEMASURE, B., FINESCHI, S., LE CORRE, V., PETIT, R. J. (1997 a) – Phylogeographic structure of white oaks throughout the European Continent. *Genetics* **146**: 1475-1487.

DUMOLIN-LAPÈGUE, S., PEMONGE, M.-H., PETIT, R. J. (1997 b) – An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology* **6**: 393-397.

DUMOLIN-LAPÈGUE, S., BODÉNÈS, C., PETIT, R. (1996) – Detection of rare polymorphisms in mitochondrial DNA of oaks with PCR-RFLP combined to SSCP analysis. *Forest Genetics* **3** (4): 227-230.

FELSENSTEIN, J. (1993) – PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA.

FERRIS, C., KING, R. A., VÄINÖLÄ, R. & HEWITT, G. M. (1998) – Chloroplast DNA recognizes three refugial sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland. *Heredity* **80**: 584-593.

FERRIS, C., OLIVER, R. P., DAVY, A. J., HEWITT, G. M. (1995) – Using chloroplast DNA to trace postglacial migration routes of oaks into Britain. *Molecular Ecology* **4**: 227-8.

FINESCHI, S., TAURCHINI, D., GROSSONI, P., PETIT, R. J., VENDRAMIN, G. G. (2002) – Chloroplast DNA variation of white oaks in Italy. *Forest Ecology and Management* **156**: 103-114.

FINKELDEY, R., MÁTYÁS, G. (2003) – Genetic variation of oaks (*Quercus* spp.) in Switzerland. 3. Lack of impact of postglacial recolonization history on nuclear gene loci. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 346-352.

GIELLY, L., TABERLET, P. (1994) – The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcl* sequences. *Molecular Biology and Evolution* **11** (5): 769-777.

GILLET, E. M. (ed.) (1999) – *Which DNA Marker for Which Purpose?* Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.

GRANJA, H., M., CARVALHO, G. S. (1995) – As datações pelo radiocarbono e o Plistocénio-Holocénico da zona costeira do NO de Portugal. *Actas da 3ª Reunião do Quaternário Ibérico*: 383-393.

GRIVET, D., HEINZE, B., VENDRAMIN, G. G., PETIT, R. J. (2001) – Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes* **1**: 345-349.

HAMILTON, M.B. (1999) – Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* **8**: 513-525.

HEWITT, G. M. (2004) – A climate for colonization. *Heredity* **92**: 1-2.

HEWITT, G. M. (2001) – Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**: 537-549.

HILLIS, D. M., MORITZ, C., MABLE, B. K. (1996) – *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A. (2ª edição).

HONRADO, J. J. (2001) – *Clima e Vegetação: Conceitos gerais, Bioclimatologia e Tipologias Biogeográficas. Um exemplo no Noroeste de Portugal Continental*. pp.19-29 Departamento de Botânica da Universidade do Porto.

HONRADO, J. J. (2003) – *Flora e Vegetação do Parque Nacional da Peneda-Gerês*. Dissertação de doutoramento. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.

IBRAHIM, K. M., NICHOLS, R. A., HEWITT, G. M. (1996) – Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* **77**: 282-291.

JENSEN, J. S., GILLIES, A., CSAIKL, U., MUNRO, R., MADSEN, S. F., ROULUND, H., LOWE, A. (2002) – Chloroplast DNA variation within the Nordic countries. *Forest Ecology and Management* **156**: 167-180.

KAINZ, P., SCHMIEDLECHNER, A., STRACK, H. B. (2000) – Specificity-Enhanced Hot-Start PCR: Addition of double stranded DNA fragments adapted to the annealing temperature. *BioTechniques* **28**: 278-282.

KÖNIG, A. O., ZIEGENHAGEN, B., van DAM, B. C., CSAIKL, U. M., COART, E., DEGEN, B., BURG, K., de VRIES, S. G. M., PETIT, R. J. (2002) – Chloroplast DNA variation of oaks in western Central Europe and genetic consequences of human influences. *Forest Ecology and Management* **156**: 147-166.

KREMER, A. (2002) – Preface. *Forest Ecology and Management* **156**: 1-3.

KREMER, A., KLEINSCHMIT, J., COTTRELL, J., CUNDALL, E. P., DEANS, J. D., DUCOUSSO, A., KÖNIG, A. O., LOWE, A. J., MUNRO, R. C., PETIT, R. J., STEPHAN, B. R. (2002) – Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection on genetic diversity in European oaks? *Forest Ecology and Management* **156**: 75-87.

LUMARET, R., MIR, C., MICHAUD, H., RAYNAL, V. (2002) – Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Molecular Ecology* **11**: 2327-2336.

MANOS, P. S., STANFORD, A. M. (2001) – The historical biogeography of Fagaceae: tracking the Tertiary history of temperate and subtropical forests of the Northern Hemisphere. *International Journal of Plant Sciences* **162** (6): S77-S93.

MANOS, P. S., ZHOU, Z.-K., CANNON, C. H. (2001) – Systematics of Fagaceae: phylogenetic tests of reproductive trait evolution. *International Journal of Plant Sciences* **162** (6): 1361-1379.

MANOS, P. S., DOYLE, J. J., NIXON, K. C. (1999) – Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12** (3): 333-349.

MÁTYÁS, G., SPERISEN, C. (2001) – Chloroplast DNA polymorphisms provide evidence for postglacial re-colonisation of oaks (*Quercus* spp.) across the Swiss Alps. *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 12-20.

MCLLENACHAN, P.A., STÖCKLER, K., WINKWORTH, R.C., MCBREEN, K., ZAUNER, S., LOCKHART, P.J. (2000) – Markers derived from amplified fragment length polymorphism gels for plant ecology and evolution studies. *Molecular Ecology* **9**: 1899-1903.

MEIRELES, J., TEXIER, J.-P. (1995) – O Quaternário do Litoral do Minho. Uma síntese lito e cronoestratigráfica. *Actas da 3ª Reunião do Quaternário Ibérico*: 395-408.

NYBOM, H. (2004) – Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* **13**: 1143-1155.

OLALDE, M., HERRÁN, A., ESPINEL, S., GOICOECHEA, P. G. (2002) – White oaks phylogeography in the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management* **156**: 89-102.

PAULO, O. S., JORDAN, W. C., BRUFORD, M. W., NICHOLS, R. A. (2002) – Using nested clade analysis to assess the history of colonization and the persistence of populations of an Iberian Lizard. *Molecular Ecology* **11**: 809-819.

PEIST, R., HONSEL, D., TWIELING, G., LÖFFERT, D. (2001) – PCR inhibitors in plant DNA preparations. *Qiagen News* **3**.

PETIT, R. J. (2004) – Biological invasions at the gene level. *Diversity and Distributions* **10**: 159-165.

PETIT, R. J., AGUINAGALDE, I., BEAULIEU, J.-L., BITTKAU, C., BREWER, S., CHEDDADI, R., ENNOS, R., FINESCHI, S., GRIVET, D., LASCOUX, M., MOHANTY, A., MÜLLER-STARCK, G., DEMESURE-MUSCH, B., PALMÉ, A., MARTÍN, J. P., RENDELL, S., VENDRAMIN, G. G. (2003) – Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* **300** (6): 1563-1565.

PETIT, R. J., BORDÁCS, S., CSAIKL, U. M., BURG, K., COART, E., COTTRELL, J., DAM, B., DEANS, J. D., DUMOLIN-LAPÈGUE, S., FINESCHI, S., FINKELDEY, R., GILLIES, A., GLAZ, I., GOICOECHEA, P. G., JENSEN, J. S., KÖNIG, A. O., LOWE, A. J., MADSEN, S. F., MÁTYÁS, G., MUNRO, R. C., OLALDE, M., PEMONGUE, M.-H., POPESCU, F., SLADE, D., TABBENER, H., TAURCHINI, D., VRIES, S. G. M., ZIEGENHAGEN, B., KREMER, A. (2002 a) – Chloroplast DNA variation in European white oaks Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* **156**: 5-26.

PETIT, R. J., BREWER, S., BORDÁCS, S., BURG, K., CHEDDADI, R., COART, E., COTTRELL, J., CSAIKL, U. M., DAM, B., DEANS, J. D., ESPINEL, S., FINESCHI, S., FINKELDEY, R., GLAZ, I., GOICOECHEA, P. G., JENSEN, J. S., KÖNIG, A. O., LOWE, A. J., MADSEN, S. F., MÁTYÁS, G., MUNRO, R. C., POPESCU, F., SLADE, D., TABBENER, H., VRIES, S. G. M., ZIEGENHAGEN, B., BEAULIEU, J-L., KREMER, A. (2002 b) – Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* **156**: 49-74.

PETIT, R. J., GRIVET, D. (2002 c) – Optimal randomization strategies when testing the existence of a phylogeographic structure. *Genetics* **161**: 469-471.

PETIT, R. J., LATOUCHE-HALLÉ, C., PEMONGE, M.-H., KREMER, A. (2002 d) – Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. *Forest Ecology and Management* **156**: 115-129.

PETIT, R. J., MOUSADIK, A. E., PONS, A. O. (1998) – Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12** (4): 844-855.

PETIT, R. J., PONS, O. (1998) – Bootstrap variance of diversity and differentiation estimators in a subdivided population. *Heredity* **80**: 56-61.

PETIT, R. J., PINEAU, E., DEMESURE, B., BACILIERI, R., DUCOUSSO, A. (1997) – Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 9996-10001.

PONS, A. O., PETIT, R. J. (1996) – Measuring and testing genetic differentiation with ordered *versus* unordered alleles. *Genetics* **144**: 1237-1245.

POTT, R. (1998) – La evolución postglaciar de los bosques frondosos caducifolios en Europa. *Itinera Geobotanica* **11**: 31-63.

RAMIL-REGO, P., TABOADA CASTRO, M. T., DÍAZ-FIERROS VIQUEIRA, F., AIRA RODRÍGUEZ, M. J. (1996) – Modificación de la cubierta vegetal y acción antrópica en la región del Minho (Norte de Portugal) durante el Holoceno. *Biogeografía Pleistocena-Holocena de la Península Ibérica*. P., Ramil-Rego, C. F. Rodríguez, M. R. Guitián, Xunta de Galicia.

RIBEIRO, M.M., LEPROVOST, G., GERBER, S., VENDRAMIN, G. G., ANZIDEI, M., DECROOCQ, S., MARPEAU, A., MARIETTE, S., PLOMION, C. (2002) – Origin identification of maritime pine stands in France using chloroplast simple-sequence repeats. *Annals of Forest Science* **59**: 53-62.

RIBEIRO, M.M., PLOMION, C., PETIT, R. J., VENDRAMIN, G. G., SZMIDT, A.E. (2001) – Variation in chloroplast single-sequence repeats in Portuguese maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 97-103.

RUIZ ZAPATA, B., CORREIA, A., I., DAVEAU, S., LECOMPT, M. (1995) – Datos preliminares sobre la evolución de la vegetación en las sierras del Noroeste de Portugal durante el Holoceno. *Actas da 3ª Reunião do Quaternário Ibérico*: 97-104.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. (2001) – *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

SCHAAL, B. A., HAYWORTH, D. A., OLSEN, K. M., RAUSCHER, J. T., SMITH, W. A. (1998) – Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* **7**: 465-474.

SOBRINO, C. M., RAMIL-REGO, P., GÓMEZ-ORELLANA, L., GUITIÁN, M. R. (1996) – Modificaciones del paisaje vegetal durante el cuaternario en el NW de la Península Ibérica. Contextualización con las secuencias del SW de Europa. *Férvedes* **3**: 117-150.

SORANZO, N., ALIA, R., PROVAN, J., POWELL, W. (2000) – Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Molecular Ecology* **9**: 1205-1211.

STEINKELLNER, H., FLUCH, S., TURETSCHKE, E., LEXER, C., STREIFF, R., KREMER, A., BURG, K., GLÖSS, J. (1997) – Identification and characterization of (GA/CT)_n microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology* **33**: 1093-1096.

SUNNUCKS, P., WILSON, A. C. C., BEHEREGARAY, L. B., ZENGER, K., FRENCH, J., TAYLOR, A. C. (2000) - SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* **9**: 1699-1710.

TABERLET, P., FUMAGALLI, L., WUST-SAUCY, A.-G., COSSONS, J.-F. (1998) – Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.

TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G., BOUVET, J. (1991) – Universal primers for amplification of three non – coding regions of chloroplast DNA. *Molecular Ecology* **17**: 1105-1109.

TEMPLETON, A.R. (2001) – Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology* **10**: 779-791.

VENDRAMIN, G. G., DEGEN, B., PETIT, R. J., ANZIDEI, M., MADAGHIELE, A., ZIEGENHAGEN, B. (1999) – High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. *Molecular Ecology* **8**: 1117-1126.

WEISING, K., GARDNER, R.C. (1999) – A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* **42**: 9-19.

WOLFE, K. H., LI, W.-H., SHARP, P. M. (1987) – Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 9054-9058.