

## Parte I: Enzimas ensaiados

### A — Revelação

Dum total de 35 actividades enzimáticas ensaiadas, em amostras de folhas e/ou sementes onde foi utilizado o meio de extracção desenvolvido no presente trabalho, houve 24 que deram sinal suficientemente intenso e nítido, em geral no lado anódico do gel, mas nalguns casos no lado catódico. A revelação duma actividade enzimática, num mesmo sistema de separação, era normalmente semelhante entre as duas espécies (as excepções são identificadas a seguir às tabelas 4.1 e 4.2). Analisam-se primeiro os casos onde a revelação da actividade em folhas foi consistente, isto é, sem haver praticamente resultados negativos de amostra para amostra ou de gel para gel.

#### 1) Consistente

Neste grupo (11 actividades enzimáticas, tabela 4.1) incluem-se apenas as que, pelo menos num sistema de separação, produziam um sinal adequado para análise na generalidade das amostras, e sem contradições entre diferentes tentativas. Apenas estas, *a priori*, poderiam servir para uma análise em larga escala.

As actividades EST e PGD foram relativamente difíceis de evidenciar de início, mas no decurso das análises em larga escala, em que foram incluídas, foram consistentes. A actividade PGM foi menos consistente em azinheira (frequentes as amostras sem sinal) que em sobreiro.

#### 2) Difusa, inconsistente, ou indeterminada

Ao contrário das da secção anterior, as actividades aqui incluídas (tabela 4.2) não ofereciam boas condições para uma análise em larga escala (que, contudo, veio a contar com a GsR, como será justificado na secção A da parte II). Num dos casos (AAT), porque o sinal, embora aparecesse consistentemente, era difuso, portanto presumia-se que não permitiria uma boa resolução das entidades moleculares e a diferenciação entre amostras; outras actividades enzimáticas eram inconsistentes, no sentido em que, quando se tentava a sua revelação no mesmo tipo de gel, frequentemente não apresentavam sinal algum, por isso não se conformando aos critérios do grupo da secção anterior; finalmente, houve vários casos (assinalados com um ponto de exclamação na tabela 4.2) em que se obteve sinal intenso e nítido num sistema (ou mais) no qual foi

feita uma única tentativa, e por isso não se pode avaliar a respectiva consistência (indeterminadas).

Aparentemente, GPT só apareceu em azinheira e não em sobreiro, não tendo sido ensaiada em linhagens de híbridos.

### 3) Actividades em sementes

Tendo-se feito em sementes um rastreio de actividades menos extenso do que em folhas, na maior parte dos casos com apenas uma análise, quase não se pode considerar a consistência de revelação excepto nas actividades (incluindo a GsR) que foram analisadas nas descendências de híbridos, que se confirmaram todas como consistentes nas sementes. Na tabela 4.3 resumem-se os resultados obtidos.

A maior parte das actividades listadas na tabela 4.1 também foram consistentes quando extraídas de sementes. De notar a melhoria de GDH no sistema R pelo menos, e possivelmente também de AAT, LAP e SOD no sistema R. Embora fosse testado uma única vez, o sistema 9 deu resultados positivos para três actividades, duas delas inconsistentes no outro sistema ensaiado.

Tabela 4.1 — Lista das actividades enzimáticas, extraídas de folhas, consideradas consistentes em pelo menos 1 sistema de separação.

Actividade <sup>a</sup>	EC	Acrónimo	Sistemas <sup>b</sup>
Fosfatase ácida	3.1.3.2	ACP	C (HR9)
Fosfatase ácida (fluorogénica)	3.1.3.2	ACP-F	R9
Catalase	1.11.1.6	CAT	R 9*
Diaforase	1.6.4.3 <sup>c</sup>	DIA	CHR 4*
Esterase	3.1.1.x (x=1,2,6)	EST	R C*
Glicerato DH	1.1.1.29	G2D	HR4
Malato DH	1.1.1.37	MDH	CH 4*
Peroxidase	1.11.1.7	PER	CH4 R*
6-fosfogluconato DH	1.1.1.44	PGD	H 4* (C)
Glucose 6-fosfato isomerase	5.3.1.9	PGI	R
Fosfoglucomutase	5.4.2.2	PGM	H (R)

<sup>a</sup> Abreviatura: DH, desidrogenase.

<sup>b</sup> Entre parêntesis, sistemas onde o sinal se apresentou algumas vezes muito fraco ou negativo (inconsistência). Os asteriscos assinalam sistemas em que foi feita uma única tentativa.

<sup>c</sup> Alternativamente, 1.6.99.1/3 [Acquaah 1992]

Tabela 4.2 — Lista das actividades enzimáticas, extraídas de folhas, consideradas mal resolvidas, inconsistentes, ou com estatuto indeterminado por não terem sido feitas repetições.

Actividade <sup>a</sup>	EC	Acrónimo	Sistemas <sup>b</sup>	Comentários <sup>c</sup>
Aspartato aminotransferase	2.6.1.1	AAT	R (H*)	sinal difuso
Álcool DH	1.1.1.1	ADH	4* (CHR)	!
Aldolase	4.1.2.13	ALD	9*	! negativo em C
Esterase (fluorogénica)	3.1.1.2	EST-F	R*9*	!
Glutamato DH	1.4.1.2	GDH	(H*M*R)	
Glutamato-piruvato transaminase	2.6.1.2	GPT	9*	!
Glutationa redutase	1.6.4.2	GsR	R*4* (H)	!
Isocitrato DH	1.1.1.42	IDH	(H4)	
Leucina aminopeptidase	3.4.11.1	LAP	(R)	negativo em C (1 vez)
3-fosfoglicerato quinase	2.7.2.3	PGK	9*	!
Chiquimato DH	1.1.1.25	SKD	M* (HR)	!
Superóxido dismutase	1.15.1.1	SOD	H* (R)	!
Tirosinase	1.14.18.1 <sup>d</sup>	TYR	C*	!

<sup>a</sup> Abreviaturas: DH, desidrogenase.

<sup>b</sup> Entre parêntesis, sistemas onde o sinal se apresentou muito fraco ou negativo em algumas tentativas. Os asteriscos assinalam sistemas em que foi feita uma única tentativa.

<sup>c</sup> Pontos de exclamação assinalam revelações possivelmente consistentes (assinaladas por asteriscos na coluna anterior) que não foram verificadas por falta de repetição.

<sup>d</sup> Alternativamente, 1.10.3.1 [Anderson 1968]

Tabela 4.3 — Lista das actividades enzimáticas, extraídas de sementes, que produziram algum sinal.

Acrónimo	Sistemas <sup>a</sup>	Comentários
AAT	9* (R)	sinal nítido em R; H: negativa (1 vez)
ACP	(R)	9: negativa (1 vez)
ACP-F	9* (R)	
ADH	(R*)	não específico? <sup>b</sup>
ALD	(H*)	H: não específico? <sup>b</sup> R9: negativa (1 vez)
DIA	C H*	
EST	R 9*	
GAPD	(H*)	não específico? <sup>b</sup>
GDH	R H*	
G2D	(R*)	não específico? <sup>b</sup>
GsR	H*	

Acrónimo	Sistemas <sup>a</sup>	Comentários
IDH	(H)	H: não específico? <sup>b</sup> R: negativa (1 vez)
LAP	R*	
MDH	C H*	
PER	C H*	
PGM	H	
PGI	R	
PGD	H	
SKD	(H*)	
SOD	R* (9*)	

<sup>a</sup> Entre parêntesis, sistemas onde o sinal se apresentou muito fraco ou negativo em algumas tentativas (inconsistência). Os asteriscos assinalam sistemas em que foi feita uma única tentativa.

<sup>b</sup> A comigração de diferentes actividades desidrogenásicas no mesmo gel levou a pôr em causa serem entidades diferentes, mas não foi feita uma verificação.

## B — Ausência de revelação

A tabela 4.4 lista as 11 actividades que não foram evidenciadas em material foliar.

Tabela 4.4 — Lista de actividades enzimáticas aparentemente indetectáveis nas amostras de folhas analisadas, com indicação dos sistemas de separação utilizados.

Actividade <sup>a</sup>	EC	Acrónimo	Sistemas <sup>b</sup>
Fosfatase alcalina	3.1.3.1	AKP	H
DH inespecíficas	1.--.-	ODH	CH (R)
Fructose bifosfatase	3.1.3.11	FBP	R (H)
Gliceraldeído PDH	1.2.1.12	GAPD	C
Glucose 6-P DH	1.1.1.49	G6PD	R (C)
Hexoquinase	2.7.1.1	HK	R
Lactato DH	1.1.1.27	LDH	CR
Enzima málico	1.1.1.40	ME	C
Peptidases	3.4.(11/13).-	PEP	R
Fosfofructoquinase	2.7.1.11	PFK	R9
Xantina DH	1.2.1.37	XDH	R

<sup>a</sup> Abreviaturas: DH, desidrogenase; P, fosfato.

<sup>b</sup> Se entre parêntesis, sinal muito fraco e/ou difuso observado uma vez

Acrescente-se a ausência de sinal de EST (sistema de separação C) e de EST-F (sistemas H e R) em sementes — 1 tentativa em todos os

casos.

Ressalve-se nesta lista o facto da maior parte destas actividades terem sido ensaiadas apenas num sistema de separação, algumas (AKP, HK, ME, PEP, XDH) uma única vez. Algumas, senão mesmo todas, poderiam eventualmente ser evidenciadas com outros sistemas de separação, ou com adaptações nos procedimentos de separação ou de revelação (até na adopção doutro método de extracção).

A análise de extractos doutras espécies, obtidos pelo mesmo método, demonstrou um sinal nítido de certas actividades que eram indetectáveis nos *Quercus*: a G6PD (sistema C) foi detectada em *Acacia melanoxylon* R. Br., *Annona cherimola* Mill., *Brachychiton populneum* R. Br., *Calistemon citrinus* (Curtis) Skeels, *Casuarina cunninghamiana* Miq., *Cocculus laurifolius* DC, *Drymis winteri* var. *chilensis* JR & G Forst/A. Gray, *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Macadamia terniflora* Muell., *Magnolia grandiflora* L., *Maurocena frangula* Mill., *Myristica fragrans* Houtt., *Nerium oleander* L., *Portulacaria afra* (L.) Jacq., *Sapindus drummondii* Hook & Arn., e *Schinus molle* L.; a ACP (sistema R) foi-o em *Annona cherimola*, *Berberis vulgaris* var. *atropurpurea* L., *Brachychiton populneum*, *Calistemon citrinus*, *Cocculus laurifolius*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Magnolia grandiflora*, *Myristica fragrans*, *Myrtus communis* L., *Piper betle* L., *Peperomia obtusifolia* (L.) Dietr., *Sapindus drummondii*, *Schinus terebinthifolium* Raddi e *S. molle* L..

## C — Sinopse

1. A maior parte das actividades enzimáticas testadas em extractos de folhas de sobreiro ou azinheira produziram algum sinal em pelo menos um sistema de separação, embora apenas uma pequena minoria (11) fossem consideradas consistentes. Em termos de sistemas de separação, houve 6 actividades consistentes no R, 5 no H, 4 no C, 2 no 4 e 1 no 9.
2. Das actividades que não chegaram a ser consideradas consistentes, houve 9 que deram bons resultados numa única tentativa e podem vir a confirmar-se após repetição. Em termos de sistemas de separação, houve 4 actividades nestas condições no 9, 2 no 4 e no R, e 1 no M, no H e no C.
3. Em extractos de sementes os resultados foram essencialmente os mesmos que nos de folhas, embora pelo menos 1 actividade se revelasse consistente apenas naquelas.
4. Certas actividades foram detectadas em folhas doutras espécies de dicotiledóneas, ao contrário dos *Quercus*, podendo nesses casos excluir-se

que fosse o método de extracção em si a causar a não-deteccção nestes últimos.

## Parte II: Análises

### A — Polimorfismos

#### 1) Discriminantes entre sobreiro, azinheira e seus híbridos

Nesta secção listam-se as actividades que podem contribuir para a discriminação, incluindo aquelas que não foram utilizadas nas análises em larga escala, mas com referência apenas aos polimorfismos interspecíficos, isto é, que servem como critério de discriminação, deixando-se para a secção seguinte os polimorfismos intra-específicos.

##### *DIA (sistema C)*

Em sobreiro (folhas e sementes): migração de 1 a 4 actividades para o lado anódico do gel, sendo a mais rápida geralmente a que dá a banda mais intensa; em azinheira (folhas e sementes): semelhante a sobreiro, mas migração substancialmente mais rápida (figura 4.1 a, c). Em análises de rotina, a distinção entre as duas espécies é muito fácil, de tal modo que o conjunto das bandas de cada amostra é classificado como “Sb” e “Az”, respectivamente.

Nos híbridos (folhas), as actividades distribuem-se numa zona difusa, aparentando uma sobreposição entre as distribuições “Sb” e “Az”, codificado como “X” (figura 4.1 b). A extensão desta zona pode variar, aparentemente por analogia com a variação entre 1 a 4 bandas das espécies-tipo. Em sementes, não houve um único caso codificável como “X”.

Os padrões “Sb” e “Az” também se podiam obter no sistema R, mas a coloração era sempre menos intensa, o que levou à preferência pelo sistema C. No entanto, no sistema R só se observou 1 banda em sobreiro e azinheira, e 1 zona difusa em híbridos.

Foi utilizada nas análises em larga escala, obtendo-se um total de 2242 zimogramas identificativos (96,2% do total de análises).

##### *MDH (sistema C)*

Em sobreiro (folhas): migração de 7 actividades para o lado anódico do gel, e 1 para o lado catódico; em azinheira (folhas): migração de 5

actividades para o lado anódico, todas comigrando com as de sobreiro, e 1 para o lado catódico (mais lenta que a de sobreiro). A distribuição de intensidades permite distinguir facilmente as amostras de sobreiro, com intensidade máxima em geral das 2ª e 4ª bandas anódicas a contar da origem, das de azinheira, onde a intensidade máxima em geral é das 2ª e 3ª bandas anódicas; a actividade catódica também constitui critério de discriminação, apesar de nem sempre se detectar em azinheira (figura 4.2 a, b). Assim, e pelo facto de se presumir terem uma codificação genética separada (cf. secção B1), a classificação das amostras faz-se separadamente para os lados + e –, este último estipulado entre parêntesis, por exemplo “Sb(Sb)” para sobreiro e “Az(Az)” para azinheira.

Nos híbridos (folhas), do lado anódico aparecem 5 bandas bem definidas, comigrando com as 5 primeiras de sobreiro, e uma zona difusa distal que migra como a 6ª de sobreiro e a 5ª de azinheira; as mais intensas são em geral as 2ª, 3ª e 4ª; do lado catódico, aparecem 2 bandas comigrantes com as de azinheira e de sobreiro (figura 4.2 c). Este padrão de bandas é “X(X)”.

A única diferença entre folhas e sementes está na actividade que migra para o lado catódico, mais rápida que a de sobreiro e constante para as duas espécies, portanto sem ter valor discriminante. Assim, nas sementes onde foi detectada, representou-se com o classificativo “fast”.

Foi utilizada nas análises em larga escala, obtendo-se um total de 2290 zimogramas identificativos (98,2% do total de análises). Das análises em folhas, as actividades do lado anódico contribuíram para classificar 97,7% das amostras, mas as do lado catódico apenas para 67,8%, em grande medida pela menor consistência das bandas de azinheira, visualizadas em apenas 44,7% das amostras que deram sinal no lado anódico (93,3% no caso das de sobreiro). Este facto terá de ser levado em conta na apreciação de material de origem híbrida, pois pode aparentar ser “Sb” no lado catódico e ser na realidade “X”.

#### *EST (sistema C)*

Realizou-se uma única tentativa, já no final do trabalho experimental, com folhas de 16 sobreiros, 5 azinheiras e 10 híbridos, e ainda 11 sementes (duma azinheira e dum híbrido). As sementes não revelaram nenhum sinal, enquanto nas folhas de sobreiro (9 amostras) e azinheira (5 amostras) apareceu 1 banda cinzento-escuro do lado catódico, mais rápida a de sobreiros, e uma actividade ténue do lado anódico, igual nas duas espécies. Nos híbridos (6 amostras), a migração desta actividade era

como nas azinheiras, pelo que é um potencial marcador discriminante entre híbridos e sobreiros. Na figura 4.3 ilustra-se o resultado obtido.

Por não terem sido feitas análises em larga escala, seria prematuro atribuir a designação “Sb” e “Az” a estas actividades, ficando a mais rápida como F e a mais lenta S, que poderão ou não confirmar-se em futuras análises corresponderem especificamente a sobreiro e a azinheira, respectivamente. A expressão nos híbridos carece de melhor esclarecimento, por não verificar-se a expectativa de codominância entre F e S.

#### *GsR (sistema H)*

Em sobreiro (folhas): migração de 3 a 7 actividades para o lado anódico do gel; azinheira (folhas): semelhante, 3 a 5 actividades, em que a mais rápida (ocorrendo em 99% dos casos) forma uma característica “banda” em crescente com a convexidade para o ânodo, e com distribuição de intensidades distinta da dos sobreiros, geralmente mais afastadas da origem (figura 4.4 a, b). Em análises de rotina, a distinção entre as duas espécies é muito fácil, de tal modo que o conjunto das bandas de cada amostra é classificado como “Sb” e “Az”, respectivamente.

Nos híbridos (folhas), as actividades distribuem-se numa zona difusa, aparentando uma sobreposição entre as distribuições “Sb” e “Az”, codificado como “X” (figura 4.4 c).

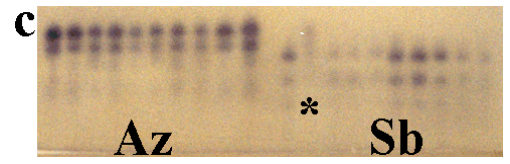
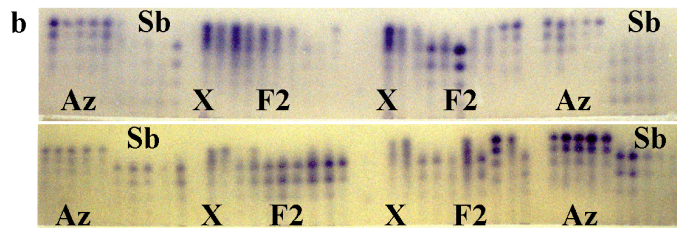
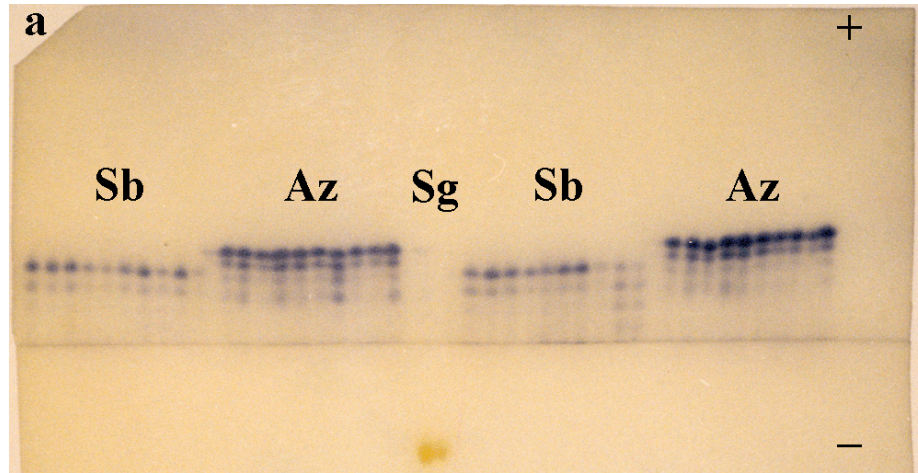
Este conjunto de características, e o facto de poder emparceirar com outras actividades separadas no mesmo sistema de separação (H), constituiu motivação para utilizar a GsR nas análises em larga escala, obtendo-se um total de 1591 zimogramas identificativos (70,6% do total de análises a folhas).

Figura 4.1 — Zimogramas DIA após separação no sistema C. a) Aspecto geral dum gel. b) Exemplos de híbridos (X) seguidos das respectivas descendências (F<sub>2</sub>). c) Exemplo duma variante “X” entre sobreiros (amostra 30AB, marcada com asterisco na imagem).

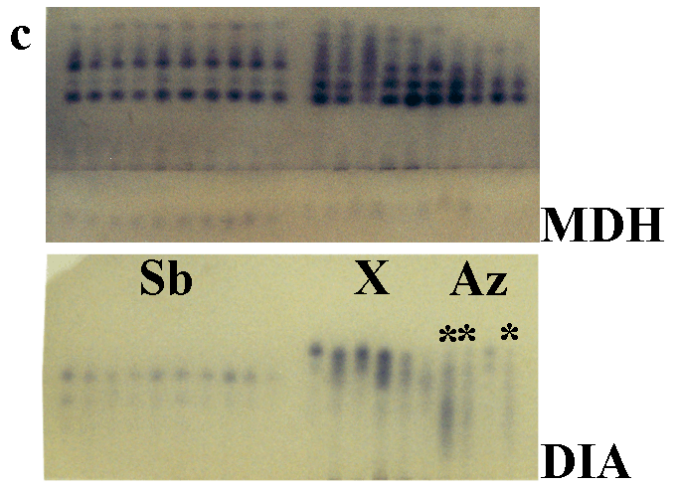
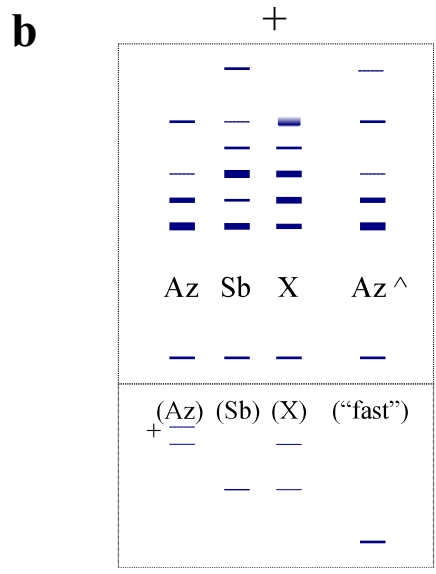
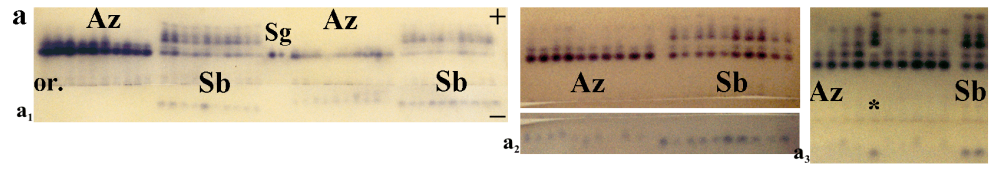
Figura 4.2 — Zimogramas MDH após separação no sistema C. a) Três exemplos da diferenciação entre sobreiro (Sb) e azinheira (Az), em a<sub>2</sub> evidenciando especialmente a banda do lado catódico, e em a<sub>3</sub> mostrando como os marcadores anódico e catódico detectam um sobreiro (asterisco, amostra 31AO) entre azinheiras. b) Esquema interpretativo (o zimograma da direita refere-se a sementes recombinantes “Az ^” com a banda catódica “fast”, cf. secção B1). c) Comparação entre zimogramas MDH e DIA para um mesmo conjunto de amostras incluindo 6 híbridos (X; da esquerda para a direita: MRM, SES, SM4, SM1, SM2, SM3) e 3 azinheiras descendentes de A36 com DIA “X” (asteriscos). Consegue-se notar a diferença de migração entre as bandas MDH do lado catódico entre os sobreiros, os híbridos e as azinheiras.



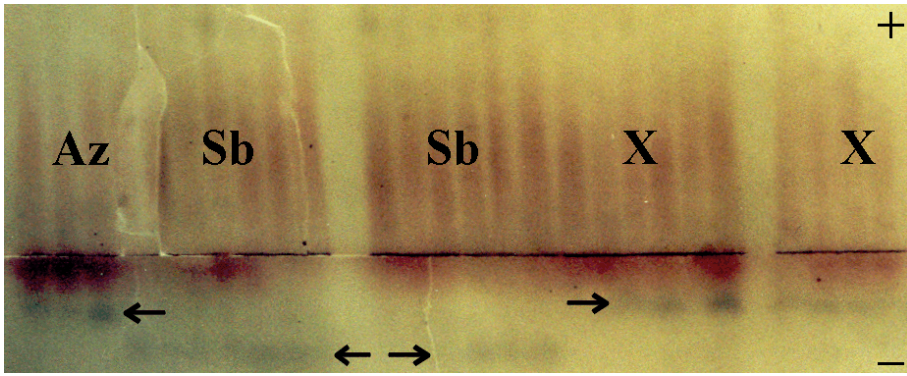
4.1



4.2

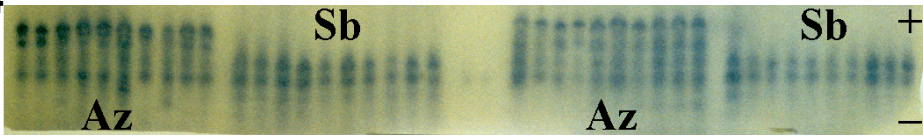


4.3

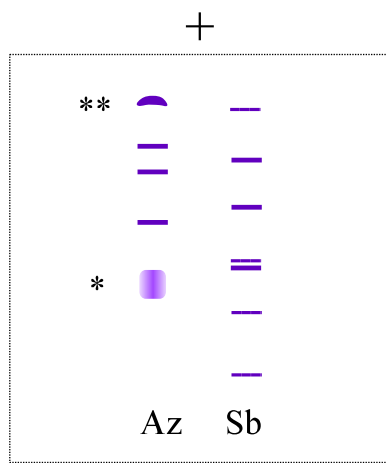


4.4

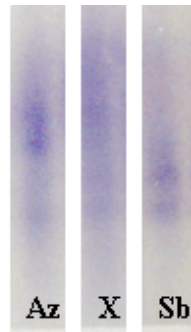
a



b

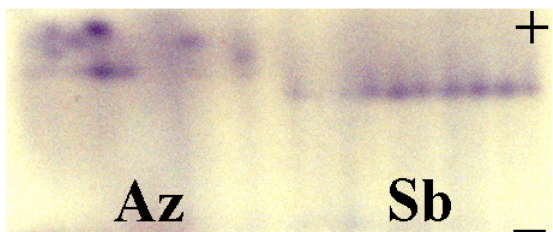


c

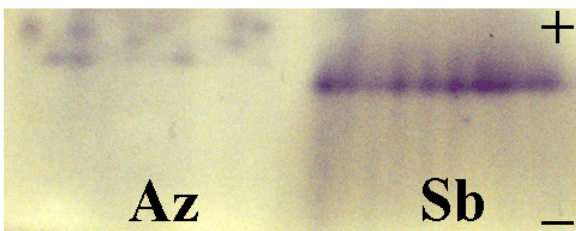
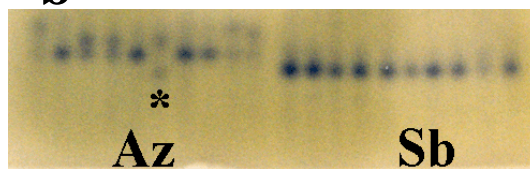


4.5

a



b



Uma única análise em sementes (de azinheiras e de híbridos) revelou uma distribuição de actividades muito diferente, com pelo menos 2 bandas por amostra no lado anódico do gel, e não permitiu determinar se há possibilidade de discriminação interspecífica.

#### *PGM (sistema H)*

Em sobreiro (folhas): migração de 1 actividade (por vezes parecendo tratar-se duma banda dupla) para o lado anódico do gel, monomórfica; em azinheira (folhas): migração de 1 ou 2 actividades para o lado anódico do gel, com muito polimorfismo (figura 4.5 a, b). Pelas posições no gel, e a partir do ânodo, as actividades foram designadas alfabeticamente (a, b, c para as de azinheira mais frequentes, e d para a de sobreiro), a que se veio juntar uma outra de azinheira, mais rápida que a, que se designou por a', e outra comigrante com a de sobreiro, que também se designou como d. Deste modo, os sobreiros eram todos d, e as azinheiras a, b, ab, etc..

Nos híbridos (folhas), a classificação deveria ser sempre uma combinação de a, b ou c, de azinheira, com d de sobreiro, mas isso foi confirmado apenas em SM3 (cd) — SM2 é d, e nos restantes não se obtiveram dados sobre as actividades PGM; no entanto, o mesmo princípio foi aplicado com sucesso às descendências de SM1, SM2 e SES (cf. secção B1), ao ponto de permitir dizer que SM1 seria ad (cf. tabela 4.10).

Foi utilizada nas análises em larga escala, obtendo-se um total de 1861 zimogramas identificativos (84,3% do total de análises a folhas, estimando-se 88,8% em sobreiros e 79,0% em azinheiras).

Figura 4.3 — Observação de actividades EST (bandas cinzento-escuro) após separação no sistema C: detalhe dum gel com 3 amostras de azinheira (Az), 13 de sobreiro (Sb), e 10 de híbridos (X). As setas assinalam as posições das bandas do lado catódico em Az/X e Sb.

Figura 4.4 — Zimogramas GsR após separação no sistema H. a) Aspecto geral dum gel com boa resolução das bandas. b) Esquema interpretativo. c) Comparação entre os padrões de azinheira, híbrido (X) e sobreiro, a partir dum mesmo gel, onde apesar da resolução das bandas não ser boa a distribuição espacial das actividades é satisfatória para a diagnose.

Figura 4.5 — Zimogramas PGM após separação no sistema H. a) Dois exemplos de variação em azinheira, confrontada com a de sobreiro. Da esquerda para a direita, os fenótipos no primeiro são ac-a'b-ac-a'c-c-?-?-ac-?-bc, no segundo a-c-ac-?-bc-ac-c-?-a'b-ac. b) Exemplo da banda d em azinheira (asterisco, amostra 28m). Da esquerda para a direita: ac-c-bc-bc-c-bd-c-c-ac-ac.

Uma única análise em sementes (de azinheiras e de híbridos) revelou uma distribuição de actividades muito diferente, com 1 a 5 bandas por amostra no lado anódico do gel, e não permitiu determinar se há possibilidade de discriminação interspecífica.

#### *PGD (sistema H)*

Em sobreiro (folhas e sementes): migração de 2 actividades para o lado anódico do gel, geralmente a mais rápida com sinal menos intenso; em azinheira (folhas e sementes): idêntico a sobreiro, mas algumas amostras (12,2%) apresentam uma 3<sup>a</sup> actividade, de migração mais lenta que as outras duas (figura 4.6 a, b). Esta banda mais lenta (designada originalmente como banda b, como se explicará na secção 2) também apareceu em 2 híbridos e nas descendências de híbridos, o que levou a considerá-la discriminante.

Assim, quando há apenas as 2 bandas constantes designou-se o padrão observado como “12”, se houver a 3<sup>a</sup> banda (que não ocorre em sobreiro) como “12+b”. Como irá detalhar-se na secção 2, a banda 1 e especialmente a banda 2 têm outros polimorfismos, mas pela sua raridade na presente amostragem não foram levados em consideração para auxiliares de discriminação.

Foi utilizada nas análises em larga escala, obtendo-se um total de 1934 zimogramas identificativos (85,8% do total de análises).

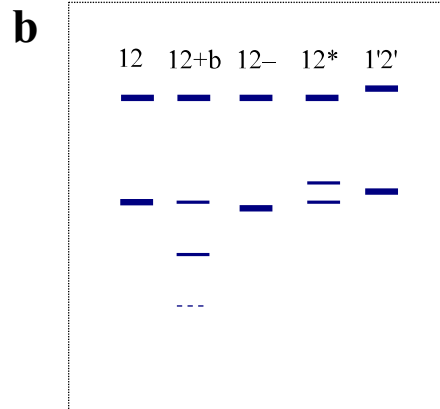
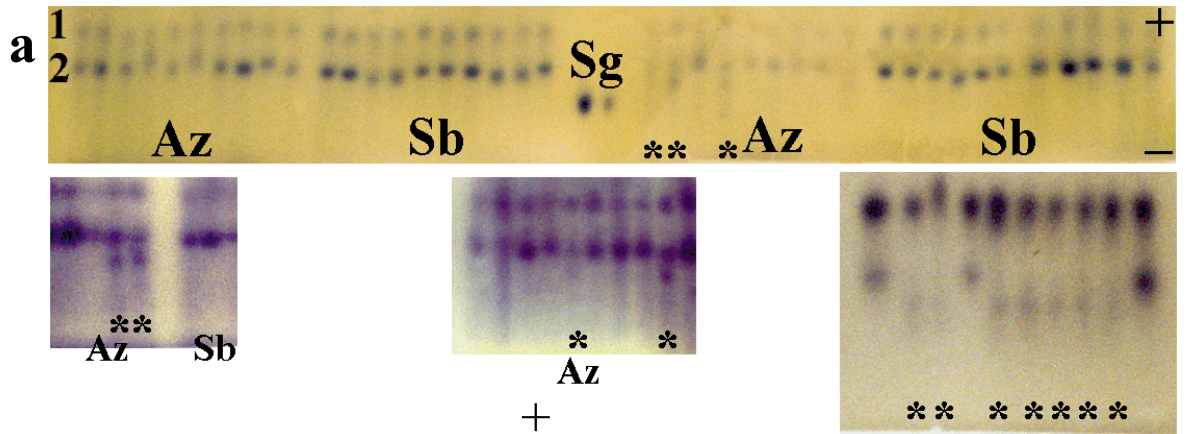
#### *PGI (sistema R)*

Em sobreiro (folhas e sementes): migração de 2 ou 4 actividades para o lado anódico do gel, sendo a mais rápida constante e as outras polimórficas; em azinheira (folhas e sementes): semelhante a sobreiro, mas as actividades polimórficas (de muito maior complexidade) em geral mais rápidas que as de sobreiro (figura 4.7 a, b).

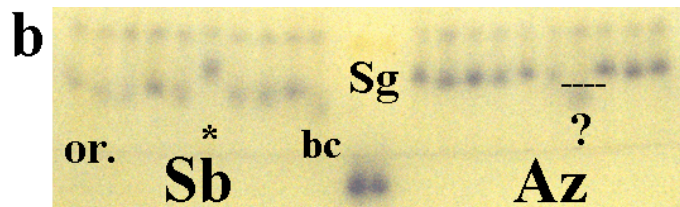
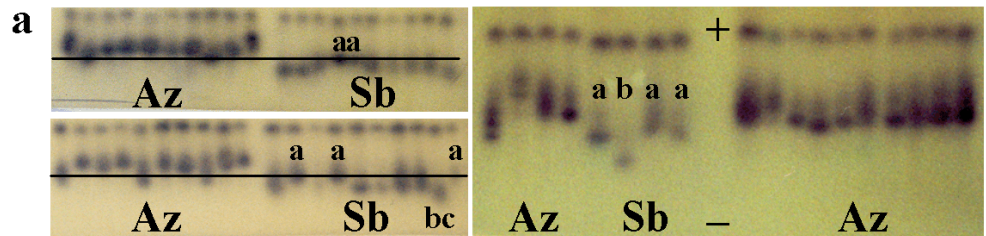
Figura 4.6 — Zimogramas PGD após separação no sistema H. a) Em cima, aspecto geral dum gel com amostras de azinheira (Az) e de sobreiro (Sb), evidenciando na banda 2 variações em ambas as espécies; em baixo, detalhe de 2 geis com a ocorrência da banda discriminante 2b, e (direita) detalhe dum gel com amostras de semente. Assinalam-se com asterisco todas as amostras com banda 2b. b) Esquema interpretativo, incluindo variações intraspecíficas (cf. secção 2).

Figura 4.7 — Zimogramas PGI após separação no sistema R. a) Ilustração das diferenças gerais entre sobreiros (Sb) e azinheiras (Az), com indicação (imagens da esquerda) da linha imaginária formada pelos zimogramas a de sobreiro e “+” de azinheira; realça-se ainda um exemplo de zimograma bc (amostra 21AG). b) Exemplos de zimogramas invulgares ou de interpretação ambígua, num gel onde também se ilustra a PGI do sangue (Sg), que migra para o cátodo; \* é uma azinheira proveniente de Santiago do Cacém (amostra 20Q); o zimograma bc é da amostra 21D; “?” (amostra 20b) é um caso vulgar, para azinheira, de migração mais lenta que a banda a de sobreiro (cuja posição se assinala a tracejado).

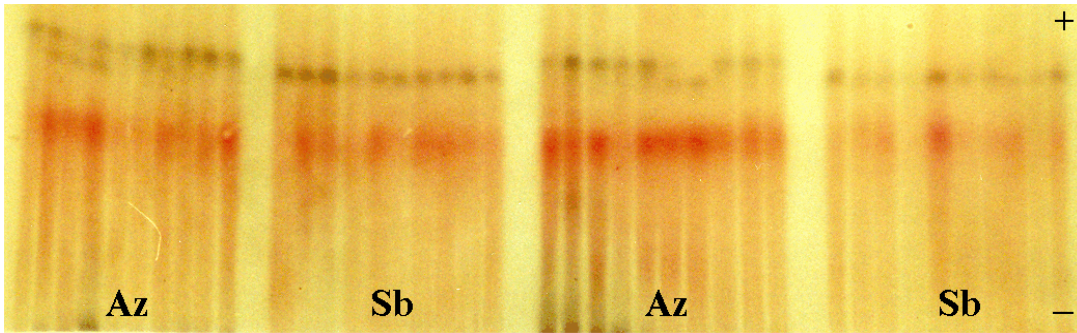
4.6



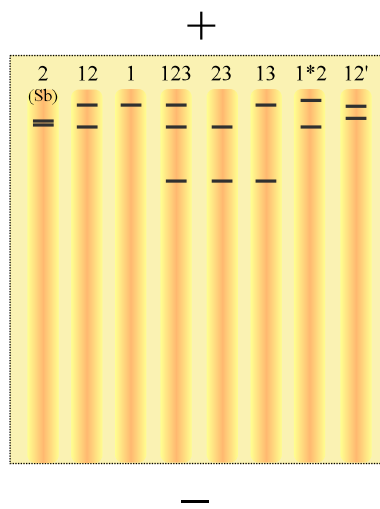
4.7



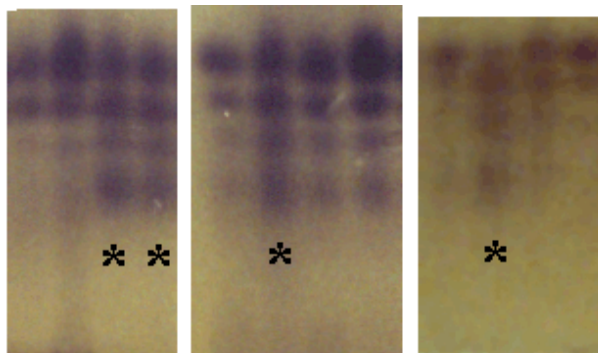
4.8  
a



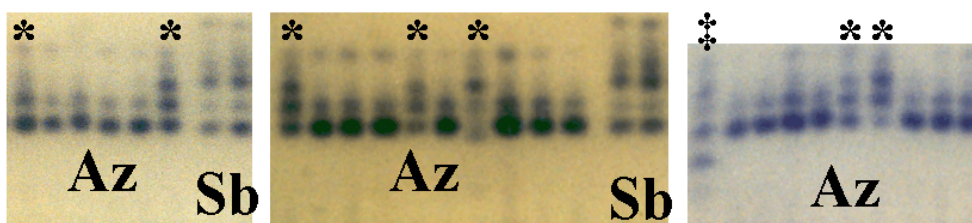
b



4.9



4.10



As actividades polimórficas de sobreiro tinham como pontos de referência duas localizações tipificadas pelas amostras com apenas uma banda nessa zona, as quais foram designadas a e b (mais rápida e mais lenta, respectivamente). As actividades polimórficas de sobreiro não migravam mais rapidamente do que a actividade que definia a posição a, que assim marcava um limite para a possibilidade de distinguir as amostras de azinheira em relação às de sobreiro; o facto das amostras apenas com 1 banda polimórfica na posição a serem frequentes em todas as electroforeses permitiu usá-las como referência visual interna para a discriminação nas azinheiras, sem necessidade de efectuar medições em cada gel (cf. figura 4.7 a): aquelas que tivessem actividades polimórficas mais rápidas eram classificadas como “Az”, enquanto as restantes (cuja actividade polimórfica comigrasse com a posição a de sobreiro) apenas podiam ser assinaladas com um “+” a assinalar a existência duma banda em posição não-discriminante. Quanto às actividades de sobreiro, quando havia 3 polimórficas isso era em geral reconhecido como uma banda mais difusa entre as duas posições de referência respectivas que correspondia ao genótipo heterozigótico (homodímero, cf. figura 2.10 b e 2.11 b), designando-se por exemplo ab quando as bandas exteriores comigravam com as posições a e b. A individualização do tripleto só foi conseguida nas revelações com camada de agarose.

Nos híbridos (folhas e sementes), a distribuição de actividades é semelhante à das azinheiras, adoptando-se o mesmo tipo de classificação (“Az”, “+”), excepto nos casos que apresentavam uma banda na posição b de sobreiro, acompanhada de 2 bandas com Rf acima do da banda a de sobreiro, classificados como “Az+b” (figura 4.7 b).

Foi utilizada nas análises em larga escala, obtendo-se um total de 2146 zimogramas identificativos (93,2% do total de análises).

### *EST (sistema R)*

Em sobreiro (folhas e sementes): migração de um par de actividades, em geral difíceis de resolver, do lado anódico do gel; em azinheira (folhas

Figura 4.8 — Zimogramas EST após separação no sistema R. a) Aspecto geral dum gel onde se evidenciam os diversos zimogramas “1”, “12” e “2” em azinheira. b) Esquema interpretativo, incluindo variações intra-específicas (cf. secção 2).

Figura 4.9 — Exemplos de variação Az\* (DIA, sistema C), assinaladas com asterisco.

Figura 4.10 — Variações na distribuição de intensidades no lado anódico dos zimogramas MDH de azinheira (padrões “Az\*”) e um raro exemplo de migração diferencial (‡, amostra 29ao).

e sementes): presença de 1 ou 2 actividades na proximidade da posição das de sobreiro, sendo uma nitidamente mais rápida que essa posição, e a outra ligeiramente mais lenta mas com uma diferença que não se pode considerar discriminante (figura 4.8 a, b). As azinheiras foram classificadas consoante tinham a banda discriminante (1), a banda não-discriminante (2) ou ambas (12), enquanto as amostras de sobreiro eram assimiladas à posição 2.

Nos híbridos (folhas e sementes) adoptou-se a mesma nomenclatura, sendo que a presença da banda 1 era discriminante em relação a sobreiro.

Foi utilizada nas análises em larga escala, obtendo-se um total de 2138 zimogramas identificativos (90,5% do total de análises).

#### *GDH (sistema R)*

Em sobreiro (folhas e sementes): migração de 1 actividade para o lado anódico do gel, com  $R_f$  em relação à frente do tampão de aproximadamente 0,2; em azinheira (sementes): semelhante, mas com  $R_f$  de aproximadamente 0,32. Em concordância com a situação da EST no sistema C, relacionada com a ausência de dados em larga escala, designou-se a actividade mais rápida como F e a mais lenta S, que possivelmente correspondem a azinheira e a sobreiro, respectivamente.

Em sementes de híbridos, encontraram-se padrões F, S ou FS.

A actividade em folhas revela-se muito mais lentamente que em sementes, sendo necessário incubar durante uma noite, e talvez por isso foi considerada inconsistente nos rastreios iniciais (cf. parte I). A sua aplicação em larga escala, em sementes, é claramente viável: 45 das 47 sementes analisadas deram zimogramas identificativos.

#### *ACP-F (sistema 9)*

Em sobreiro (folhas): migração de 1 actividade para o lado anódico do gel; em azinheiras (folhas): semelhante a sobreiro, mas mais lenta ( $R_f$  0,62–0,63 em referência à de sobreiro). Analogamente ao que se fez com a EST no sistema C e a GDH no sistema R, classificou-se a actividade mais rápida como F e a mais lenta como S, que possivelmente correspondem a sobreiro e a azinheira, respectivamente.

Devem observar-se as bandas antes de 1 hora de incubação, altura em que já existe demasiada difusão para uma resolução fiável; as de azinheira costumam ser mais intensas e observam-se facilmente ao fim de 30 minutos.

Não foram feitas observações em híbridos.

Em sementes a actividade pareceu ser menos consistente, mas com



distribuição idêntica à das folhas, pelo menos em azinheira.

Com o sistema R, esta actividade (em folhas) é menos consistente e não parece permitir discriminação.

## 2) Intra-específicos

### *DIA (sistema C)*

Houve variações na distribuição das intensidades, pois em vez de ser máxima na actividade mais rápida, como no que se considerou ser o padrão (figura 4.1), era mais ou menos uniforme em diversas amostras. Infrequentes, estas variações não interferiam com a discriminação e foram assinaladas com um asterisco, isto é, “Sb\*” (1,8% das “Sb” em sentido lato), “Az\*” (5,4% das “Az”) ou “X\*” (1,1% das “X”). Na figura 4.9 ilustram-se algumas destas variantes.

### *MDH (sistema C)*

Também ocorreu uma variante na distribuição de intensidades no lado anódico, apenas nos padrões “Az” (10,4% foram registados) e “X” (não registados). Esta variação causou muitas dificuldades na distinção entre os padrões híbridos e os padrões “Az\*”, como se ilustra na figura 4.10: em rigor, só o aspecto difuso da actividade mais rápida em X, e a presença da 2ª mais rápida (quando é detectável e bem resolvida), é que permitem distingui-los de “Az\*” (cf. figura 4.2 b).

Outra variação observada, bastante rara (pelo menos 1 exemplo em cada espécie, assinalado com o símbolo ‡), caracterizou-se pela migração mais lenta do conjunto de bandas do lado anódico. As duas amostras onde isso foi notado foram submetidas a 2ª electroforese e o padrão manteve-se.

A actividade de azinheira que migra para o lado catódico do gel pode ser substancialmente mais lenta que o normal, o que se observou em 1,7% das amostras de azinheira e foi representado por “(Az+)”.

### *PER (sistema C)*

Estima-se que foram 17 as actividades diferentes resolvidas no decurso das análises de larga escala. Os zimogramas PER foram divididos em 5 regiões, numeradas do ânodo para o cátodo, registando-se os resultados para a região 1, com uma única banda que se inicialmente pareceu ser diagnosticante de azinheira, a região 2 englobando 5 bandas, e a região 4, no lado catódico, compreendendo 7 bandas; as regiões 2 e 4 demonstraram bastante polimorfismo nas duas espécies, enquanto a região 3 (3 bandas próximas da origem de migração, 1 delas do lado

anódico) e a região 5 (a actividade mais rápida do lado catódico) parecem ser constantes. Em todos os zimogramas as actividades do lado catódico eram muito menos intensas do que as do lado anódico. Na figura 4.11 ilustram-se as posições relativas das diversas bandas e a sua codificação no presente trabalho, e na figura 4.12 exemplifica-se a correspondência entre os zimogramas PER e outros, para um mesmo conjunto de amostras. A codificação para as bandas na região 2 foi alvo de algumas revisões perspectivando critérios de discriminação envolvendo algumas das bandas que aqui se encontram, daí a aparente incoerência das classificações feitas, mas que o esquema desta figura permitirá esclarecer.

A banda da região 1 acabou por ser excluída como critério de discriminação entre as espécies, nomeadamente para distinguir sobreiros de híbridos: 12,4% dos sobreiros identificados como tal pelo seu perfil isoenzimático apresentavam-na, assim reduzindo a especificidade deste marcador para azinheira; nos híbridos e suas descendências registou-se a banda 1 em 64,3% das amostras analisadas (tabela 4.5).

Tabela 4.5 — Expressão da banda 1 nas amostras de sobreiros, azinheiras e híbridos. “Indeterminado” refere-se a amostras onde não foi registada presença ou ausência da banda 1.

Banda 1	Sobreiros	Azinheiras	Híbridos & F <sub>2</sub>
Presente	12,4%	95,5%	64,3%
Ausente	64,5%	1,1%	7,0%
indeterminado	23,1%	3,3%	28,7%

Contando apenas com as amostras onde foi feito o registo de presença ou ausência da banda 1, determina-se para este marcador uma especificidade de 83,9% e uma sensibilidade de 98,8%. A percentagem de híbridos e suas descendências com a banda 1, entre as registadas, foi de 90,2%, muito acima dos esperados 57,4% assumindo um valor intermédio entre sobreiro e azinheira.

No sistema de separação 4, a banda 1 é resolvida como um conjunto de 2 a 3 bandas, e o facto de variar a sua localização no gel frequentemente (figura 4.12 a), leva a pensar que existe um polimorfismo, nomeadamente nas azinheiras, associado a este marcador.

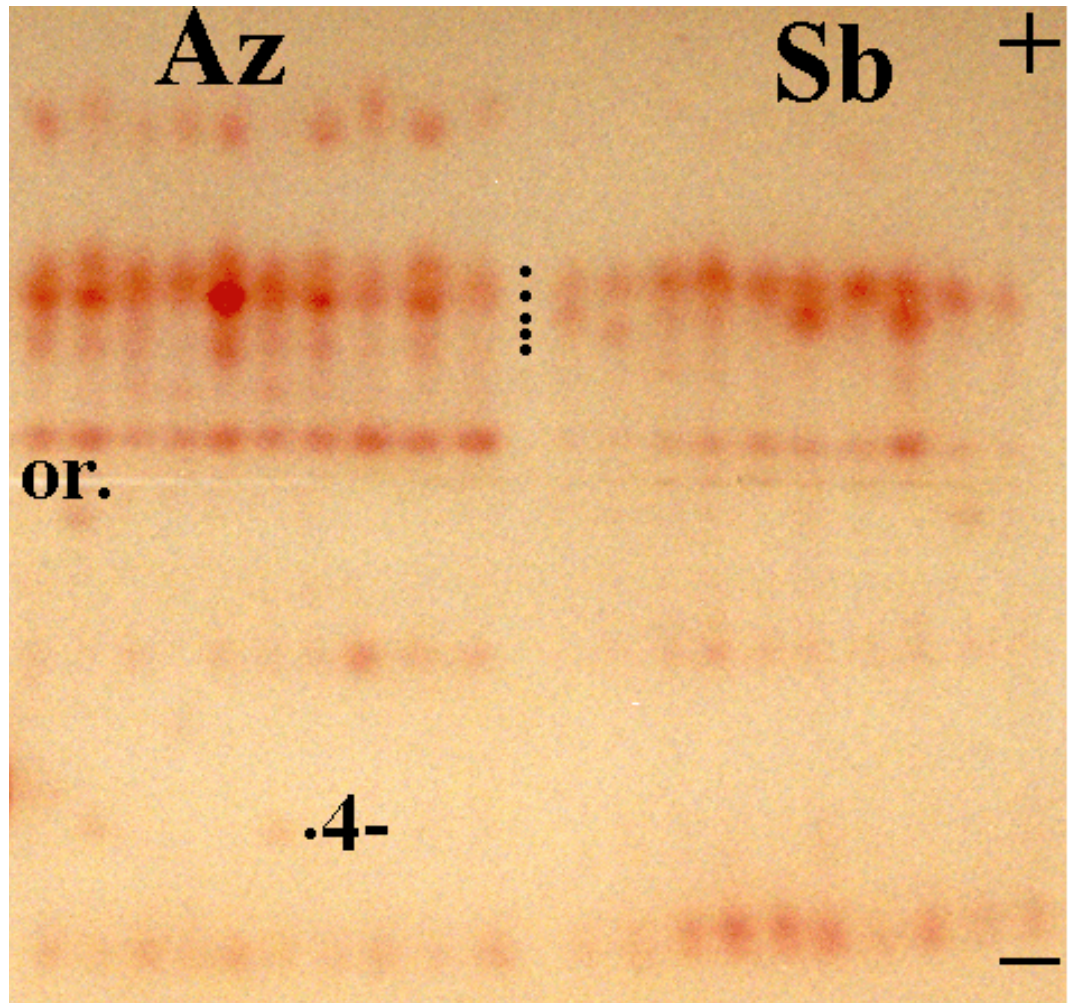
A banda 1 não foi detectada em sementes.

---

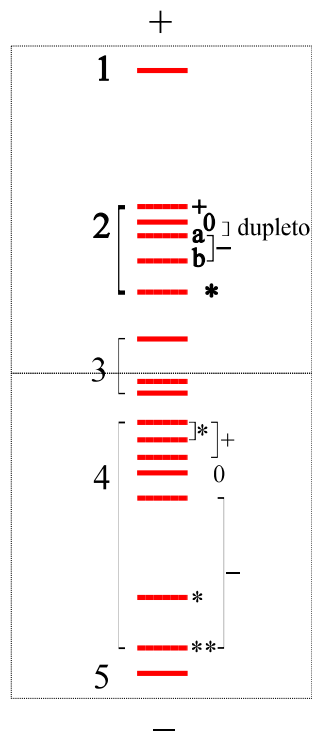
Figura 4.11 — Zimograma PER após separação no sistema C. a) Conjunto de amostras de azinheira (Az) e de sobreiro (Sb). Os pontos assinalam posições de bandas para as regiões 2 e 4—. b) Esquema interpretativo: bandas em traço contínuo, praticamente constantes em pelo menos uma das espécies; a tracejado, bandas variáveis.

---

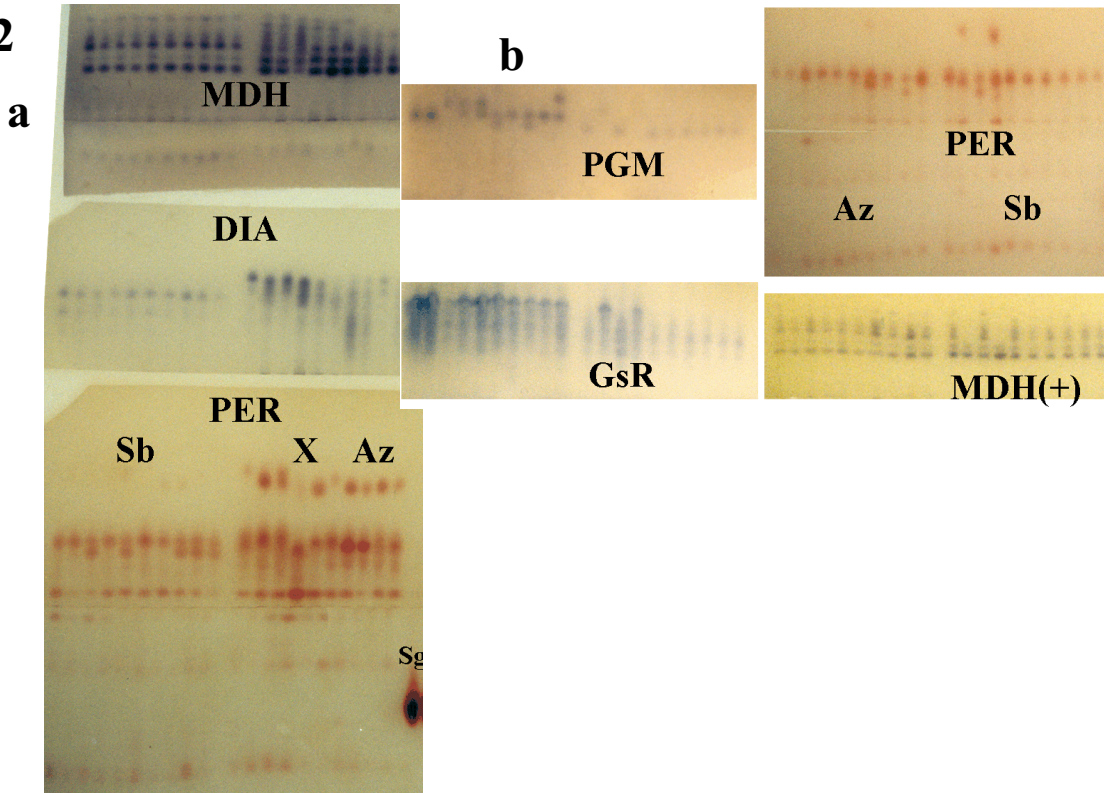
4.11  
a



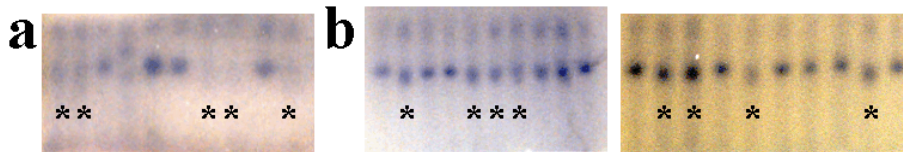
b



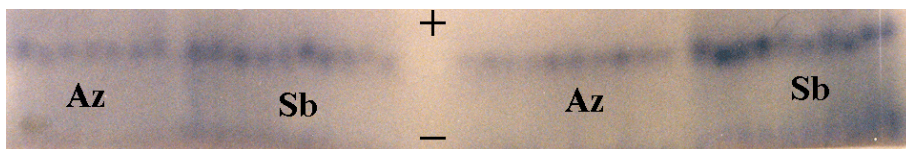
4.12



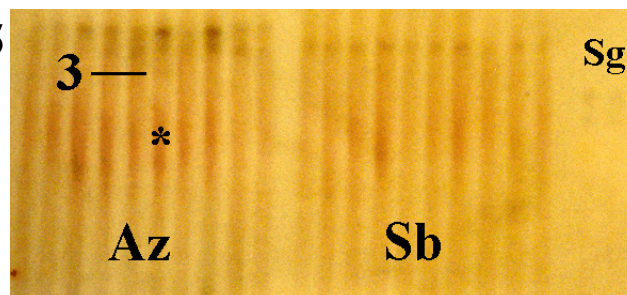
4.13



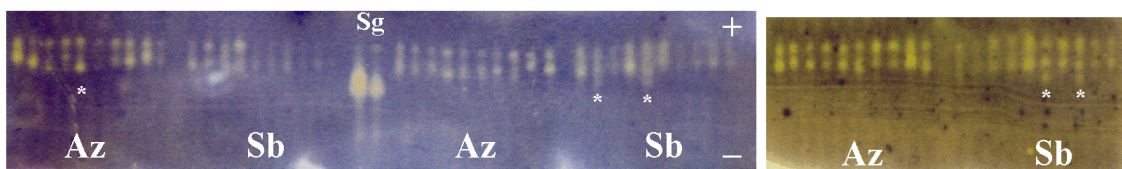
4.14



4.15



4.16



Nenhuma das variantes nas regiões 2 e 4 foi marcador útil para a discriminação. Apenas há a registar que qualquer das bandas polimórficas na região 4 teve uma prevalência inferior a 0,5% em sobreiro, o que talvez permita considerar as bandas + (6,7% em azinheira) e – (8,5%) como critérios auxiliares para a detecção de hibridismo; nos híbridos e suas descendências houve 2,7% com a banda +, e 1,3% com banda –. Quanto à região 2, ambas as espécies apresentaram as mesmas actividades, mas as bandas – (25,2% em sobreiro e 3,0% em azinheira) e \* (2,5% em sobreiro e 11,0% em azinheira) eram de frequências bem diferentes numa espécie para a outra.

Foram analisadas 2199 amostras, das quais apenas uma (amostra 38.29) não deu sinal interpretável.

#### *ADH (sistema C)*

Esta actividade revelou-se apenas numa electroforese, em folhas de adultos das duas espécies e de 2 híbridos, com uma única actividade a migrar para o lado anódico do gel, com ligeiras diferenças (na ocorrência, 6 a 8 mm da origem) que não se voltou a ensaiar, para verificar se eram reprodutíveis e se podiam ter alguma utilidade para as análises a realizar. O polimorfismo nesta amostragem foi maior em sobreiro do que em azinheira, mas as formas “6”, “7” e “8” estavam presentes em ambas.

#### *GsR (sistema H)*

A variação em azinheira e em sobreiro resumiu-se a aparecerem ou não algumas bandas menos consistentes, e também a distribuições de

Figura 4.12 — Exemplos de correspondência entre os zimogramas PER (sistema C) e outros, para um mesmo conjunto de amostras. a) Três réplicas dum mesmo gel contendo 10 amostras de sobreiro (Sb), 6 de híbridos (X) e 4 de azinheiras (Az) após electroforese no sistema C, com revelação das actividades enzimáticas MDH e DIA (cf. figura 4.2c) e PER. b) Duas azinheiras contaminantes numa família de sobreiro (amostras 25AV e 26B) identificadas como tal nos zimogramas PGM (apenas a primeira), GsR, PER (presença da banda 1) e MDH. Fenótipos PGM das azinheiras: c-c-b-bc-bc-cd-c-cd-c-ac; b (25AV).

Figura 4.13 — Variações intra-específicas dos fenótipos PGD. a) Banda “a” ou “2\*” em azinheira (amostra 21d); os asteriscos assinalam amostras com a banda b (pouco visível). b) Banda 2– em sobreiro (asteriscos, cf. também figura 4.6 a).

Figura 4.14 — Zimograma SKD após separação no sistema H, notando-se algumas variações entre amostras de sobreiro, principalmente, mas também em azinheira.

Figura 4.15 — EST: exemplo de ocorrência de banda 3 (amostra 29z, fenótipo 123).

Figura 4.16 — Zimogramas SOD após separação no sistema R. Os casos de 3 bandas são assinalados com asteriscos.

intensidade diferentes (a ausência de certas bandas em azinheira foi codificada como Az\* e Az\*\*, referenciada na figura 4.4 b), analogamente ao que foi descrito para DIA, mas que não interferiram com a discriminação.

#### *PGM (sistema H)*

Enquanto em sobreiro (folhas) era aparentemente monomórfica (na realidade, em muitos zimogramas parecia tratar-se dum duplete de bandas que era difícil de resolver e podia eventualmente implicar alguma variação), a PGM em folhas de azinheira mostrou-se altamente polimórfica, permitindo adoptar um sistema simples de classificação segundo a migração de cada uma das actividades, como já referido anteriormente. Visto ser a mais frequentemente observada em azinheiras (presente em cerca de 65% das amostras analisadas), a actividade c serviu de referência para a determinação do Rf (tabela 4.6):

Tabela 4.6 — Valores de Rf estimados para as diferentes bandas observadas em azinheira, usando como referência a posição da banda c (na mesma amostra ou interpolando entre as mais próximas no mesmo gel).

Banda	Rf	nº medições
a'	1,29–1,33	5
a	1,19–1,21	32
b	1,10–1,12	25
c	1,00	—
d	0,84–0,86	3

Este polimorfismo em azinheira será alvo de outras análises na secção B2.

#### *PGD (sistema H)*

No início do presente estudo foram detectadas duas variantes da banda 2, que foram designadas a e b (mais rápida e mais lenta que o padrão, respectivamente). Só a presença em azinheiras e híbridos da banda b discriminante se veio a demonstrar frequente, enquanto todas as outras variantes, tanto em sobreiro como em azinheira, eram raras (porém, é de admitir que certas diferenças subtis passassem despercebidas, em especial a banda 2—, ocorrendo com alguma frequência em sobreiro, que aparece como banda 2 mais lenta e mais difusa). Usando como referência a banda 1 (na sua variante “normal”), os valores de Rf obtidos foram: banda 2, 0,67–0,68 (58 medições); banda b, 0,50–0,54 (24 medições); banda 2\* (já referida como banda a), 0,70–0,75 e/ou 0,83 (4 medições,

possivelmente heterogénea). Não foram obtidos valores de Rf para as outras bandas (1', 2', 2-). Pelos menos as bandas a, b e 2- podem corresponder a heterozigóticos, mas não foi possível demonstrá-lo a partir dos dados recolhidos. A figura 4.13 ilustra algumas das variações encontradas (também com referência à figura 4.6 a, b), e na tabela 4.7 detalham-se as respectivas frequências nas duas espécies.

Tabela 4.7 — Distribuição dos polimorfismos de PGD em sobreiro (1028 amostras) e em azinheira (1048 amostras). Apenas se consideraram as amostras com actividades PGD identificáveis e cuja identidade taxonómica foi estabelecida sem ambiguidades pelo conjunto dos fenótipos isoenzimáticos obtidos em cada uma.

fenótipos	Sobreiro	Azinheira
observados	892	903
1'2'	2,7%	0,3%
banda b	0,0%	12,2%
banda 2*	0,1%	0,8%
banda 2-	0,6%	0,0%

#### *SKD (sistema H)*

Esta actividade foi muito inconsistente, não pareceu ser discriminante, e acabou por não ser adoptada para análises em larga escala. No entanto, registou-se algum polimorfismo principalmente em sobreiro (também visível quando se usou o sistema R), traduzido em diferenças muito subtis de migração (figura 4.14).

#### *PGI (sistema R)*

O polimorfismo da PGI em ambas as espécies era notório em todos os géis, e nos casos em que a actividade polimórfica era constituída por 3 bandas, e com base na suposição de ser híbrida entre as duas de referência delimitando o tripleto, como já exposto na secção anterior, designava-se o zimograma por justaposição, no caso do sobreiro ab, ac, ou bc (a actividade  $\underline{c}$  era infrequente e só apareceu isolada numa única amostra proveniente de Espanha, cf. parte IV, secção A). Nas azinheiras o polimorfismo era de tal maneira complexo que, por não constituir objectivo primário do presente trabalho, não foi registado sistematicamente. Mas houve um gel onde isso foi tentado, permitindo uma listagem provisória da variação também nesta espécie, paralelamente à de sobreiro. A mesma vem expressa pelos valores de Rf, medidos em relação à banda constante nas duas espécies (tabela 4.8).

De realçar a existência duma banda em azinheiras que parece ser mais

lenta que a banda a de sobreiro, mas que em zimogramas bem resolvidos poderá ser diferenciada dessa e da banda b. O polimorfismo em sobreiro será alvo de outras análises na secção B2.

Tabela 4.8 — Valores de Rf medidos para as diferentes bandas observadas em azinheira e sobreiro, usando como referência a posição da actividade monomórfica (banda 1) na mesma amostra. Os valores de Rf para as bandas de sobreiro representam margens de variação entre valores médios nas diferentes electroforeses (10 para a banda a e 6 para a banda b), patenteando a incerteza quanto aos valores exactos, relacionada com o aspecto difuso das bandas quando se utiliza a imersão para revelar as actividades. Em azinheira, o total de medições com Rf entre 0,61 e 0,65 foi 8.

Rf (azinheira)	n° medições	Banda de sobreiro	Rf
0,78	1		
0,74–0,76	3		
0,69–0,71	3		
0,63–0,65	5–6		
0,61–0,63	2–3		
0,59–0,60	5		
0,56–0,57	2	a	0,54–0,60
0,50–0,52	4	b	0,41–0,46
		c	0,35

De maior relevância para o presente estudo é a proporção de azinheiras com fenótipo “+”, isto é, indistinguível da banda a de sobreiro. A sua frequência nas descendências classificadas como azinheira variou entre 6% em Feijoas e 24% em Azeiteiros, globalmente 19% (nas dos híbridos, como seria de esperar, era mais elevada ainda, 37%). Tratando-se de homocigóticos para este *locus*, conclui-se ser um dos alelos de azinheira mais frequentes, senão mesmo o predominante, mas o facto de ser dos mais lentos não é consistente com resultados anteriores em Espanha e no Algarve [Michaud *et al.* 1995], o que teria de investigar-se num estudo mais centrado neste polimorfismo.

#### *EST (sistema R)*

Para além das bandas EST 1 e 2 em azinheira (e as aparentemente constantes “2” de sobreiro), registaram-se outras ocorrências que se designaram como 1\* ou 1' (actividade ligeiramente mais rápida do que a 1 de azinheira) e 2' (mais rápida que a 2, quase a meio em relação à banda 1). Actividades com migração substancialmente mais lenta, designadas segundo o mesmo critério como 3 e 4, foram observadas nas



duas espécies (figura 4.15, e figura 4.8 b). Como mostra a tabela 4.9, apenas a ocorrência de bandas “3” se pode considerar de algum significado.

Tabela 4.9 — Distribuição dos polimorfismos de EST por sobreiro (945 amostras) e por azinheira (957 amostras). Apenas se consideraram as amostras com actividades EST identificáveis e cuja identidade taxonómica foi estabelecida sem ambiguidades pelo conjunto dos fenótipos isoenzimáticos obtidos em cada uma.

	Sobreiros	Azinheiras
banda 1	0,0%	92,4%
banda 2	100,0%	59,6%
banda 3	0,8%	2,1%
banda 2'	0,2%	0,3%
banda 4	0,0%	0,2%
banda 1*	0,0%	0,1%
banda 1'	0,0%	0,1%

### SOD (sistema R)

Sobreiros e azinheiras apresentam em geral 2 actividades migrando para o lado anódico do gel, evidenciadas como bandas relativamente difusas por contraste negativo (figura 4.16). A actividade mais rápida é constante, e a mais lenta tem um Rf (referente à banda constante) variável de amostra para amostra, mas dentro duma margem estreita (sobreiro: Rf 0,80–0,90; azinheira: 0,84–0,92) que pode tornar problemática a interpretação de cada variante. Nalgumas amostras (duma e doutra espécie) observa-se uma 3ª actividade, ligeiramente mais lenta ainda (Rf 0,73–0,80 em sobreiro e 0,82–0,84 em azinheira). A obrigatoriedade de medir o Rf em cada amostra, e o facto de não serem discriminantes, levou a que não se fizesse um registo sistemático destas variações.

Omitindo o NAD da solução usada para revelar as SOD, a generalidade das amostras só apresentavam 1 actividade, apenas se visualizando 2ª banda nos sobreiros e nas descendências de híbridos (alguns destes até com uma 3ª banda). Se bem que não tenha sido feita uma comparação directa, aparentemente é a actividade polimórfica (intra-especificamente) que deixava de observar-se; contudo, com esta modificação (e talvez outros aperfeiçoamentos a montante, nomeadamente na selecção doutro sistema de separação, ou recurso a sementes) poderia talvez ganhar-se um marcador de hibridismo.

*IDH (sistema 4)*

Apesar de não ser muito consistente, esta actividade apresenta 1 ou 2 bandas por amostra, do lado anódico do gel, sendo que a segunda banda corresponde a uma actividade que migra muito mais rapidamente e é muito menos intensa. Quanto à banda mais intensa, nalgumas amostras ela pareceu ter uma localização ligeiramente diferente (migração mais lenta, aspecto difuso). Estas variantes foram observadas em amostras de adultos do povoamento misto da Mitra, e pelo menos nesta amostragem ocorreram quase exclusivamente em sobreiro.

**3) Sistemas não-polimórficos**

O aparente monomorfismo de ACP (sistema C), CAT, G2D e LAP (sistema R), apesar de serem bastante consistentes, fez com que fossem preteridos das análises de rotina.

**B — Interpretações genéticas**

Embora sem a realização de cruzamentos controlados para verificar o modo de segregação das variantes intra-específicas e interespecíficas, a dedução de interpretações genéticas não deixou por isso de ser possível: o conhecimento dos zimogramas das árvores-mãe permitiu formular hipóteses genéticas para alguns dos polimorfismos intra-específicos, e as descendências dos híbridos permitiram o mesmo para alguns dos polimorfismos interespecíficos. Em certos casos pôde ainda levar-se em conta observações doutros autores em espécies do género *Quercus*. Seja a nível intra-específico ou interespecífico, os genótipos das árvores-mãe e suas descendências permitiram ainda deduzir os genótipos dos grãos pólen intervenientes.

**1) Famílias dos híbridos***DIA e GsR*

Sem excepção, DIA e GsR apresentavam-se nas famílias descendentes de híbridos numa de 3 maneiras: como nos híbridos (“X”), como nos sobreiros (“Sb”), ou como nas azinheiras (“Az”) — ou seja, não apareceram novas variantes. Esta observação permite deduzir que apenas 2 alelos, 1 por espécie, produziram a variação, e que o aspecto difuso dos padrões “X” sugere uma estrutura quaternária oligomérica.

A multiplicidade de bandas correspondentes a cada alelo teria então de explicar-se através de variações epigenéticas (no sentido mais lato do termo), que se sabe serem comuns em isoenzimas e até motivaram a

introdução do conceito de isoenzimas secundários [Poly 1997]. As hipóteses que podem produzir alterações no ponto isoeléctrico vão desde a transcrição alternativa (isto é, a partir de diferentes promotores), *splicing* alternativo, etc., às modificações pós-tradução; neste último nível só por si, a complexidade de situações é muito grande.

Uma outra possibilidade é a modificação *in vitro*, geralmente relacionada com as condições de extracção, de conservação, ou ainda durante a electroforese [Poly 1997]. Não havia lugar no presente trabalho para testar as diferentes hipóteses para cada actividade, mas o facto das actividades DIA se apresentarem como uma única banda quando a separação é feita no sistema R leva a colocar a hipótese de tratar-se dum artefacto da electroforese, possivelmente um fenómeno de polimerização. Certos polimorfismos enzimáticos registados, por exemplo para os padrões “Az\*” e “Sb\*” da DIA, podem resultar de variações nesse tipo de interacção (diferentes graus de polimerização) e não terem qualquer significado genético.

#### MDH

Verificou-se que a banda do lado catódico do gel se expressa nas descendências dos híbridos como se tratasse dum único *locus* codominante, e ainda que a variação no lado anódico se produzia separadamente, isto é, num *locus* (ou mais) diferente(s).

Esta última mostrou-se aliás de grande complexidade, presumivelmente agravada pela variação das distribuições de intensidades e consequentes dificuldades em classificar as amostras. Por exemplo, a actividade mais rápida de sobreiro ocorre por vezes em zimogramas que de outra maneira seriam classificados como sendo de azinheira ou de híbrido (registando-se esses casos como “Az<sup>^</sup>” e “X<sup>^</sup>”, respectivamente, figura 4.2 b). Outro zimograma foi designado X', semelhante ao X mas intermédio com Sb. É provável que estes padrões tenham surgido de recombinação em mais do que 1 *locus* nos híbridos, mas a interpretação genética exacta não foi possível.

Assim, excepto pela provável independência entre marcadores catódicos e anódicos, que aliás contribuiu para considerá-los separadamente nas análises, a única hipótese sobre a hereditariedade para estes isoenzimas resume-se à que foi acima enunciada para os marcadores catódicos.

#### PGM e PGI

Todas as descendências de híbridos analisadas (plantas) incluíam

zimogramas PGM característicos de azinheira (“a”, “ac”, “c”), de sobreiro (“d”) e de híbridos (“ad”, “bd”, “cd”), compatível com a noção de que cada banda corresponde a um enzima monomérico codificado num único *locus* de alelos codominantes, em que os heterozigóticos apresentam 2 bandas e os homozigóticos 1 banda (cf. fig. 2.10b e 2.11b). Já no que respeita à sementes, por não se dispor de dados em sobreiros e estes serem muito limitados em azinheiras, ainda não é possível interpretar os zimogramas obtidos.

Como referido na secção A1, as actividades PGI nas descendências de híbridos (folhas ou sementes) praticamente não diferem das de azinheira, e por isso foram classificadas como “Az” ou “+”; apenas numa minoria dos casos esta actividade fornecia informações úteis, mas um estudo mais atento da diversidade alélica em azinheira poderá vir a torná-lo ainda mais útil.

#### *Outros marcadores*

As actividades PER, EST (sistemas R e C) e GDH (esta só em sementes) não deram lugar a qualquer análise genética. Para EST (sistema C) e GDH isso pode dever-se à reduzida amostragem efectuada, para PER à complexidade dos zimogramas e aparente inconsistência entre diferentes extractos dum mesmo indivíduo, e para EST (sistema R) à incongruência entre os adultos e suas descendências. É plausível que os polimorfismos observados em PER e EST sejam uma expressão condicional, por exemplo em resposta a estímulos ambientais, de tal maneira que seja impossível dizer, em dado indivíduo, se a ausência duma determinada banda terá a ver com a ausência de expressão do respectivo gene ou com a substituição deste último por um seu alelo.

## **2) Famílias intra-específicas**

### *PGM (azinheiras e híbridos)*

A hipótese que a actividade PGM em folhas de azinheira e de híbridos e suas descendências é monomérica (como em *Q. robur* [White & White 1997, Gehle 1999]) e codificada num único *locus* com 5 alelos codominantes, cada um para uma das diferentes actividades resolvidas (a, a, b, c, e d), foi testada pela comparação entre cada família e a respectiva árvore-mãe — embora a efectividade deste procedimento seja afectada pela ocorrência (aliás frequente) de contaminantes originários de outras árvores, às vezes até da outra espécie, de que resultariam dúvidas sobre a hipótese em causa. Por exemplo, uma árvore com PGM c é considerada homozigótica e por isso todos os descendentes têm de conter a mesma

banda c, acompanhada ou não de 2ª banda caso o alelo recebido com o pólen codificasse ou não (respectivamente) outra actividade; as descendentes dum árvore com PGM ac têm de conter pelo menos a ou c, etc..

Tabela 4.10 — Separação entre descendentes e contaminantes, para cada árvore (azinheiras e, em Outeiro, híbridos), com base na interpretação genética para os zimogramas PGM obtidos: enzima monomérico codificado num único *locus* com alelos codominantes.

Local	Árvore	PGM	descendentes		contaminantes		indeterminados
			PGM	obs.	PGM	obs.	obs.
Mitra	M04	c	bc, c	5	b	1	0
	M12	c	ac, bc	4	a, ab	5	1
	M13	ac	a'c, a, ac, bc, c	23	b	3	5
	M19	ac	a, ab, c	4	b	1	0
	M21	c	ac	1	—	0	0
	M25	c	c	1	—	0	0
	M37	c	ac, bc, c	22	—	0	2
	M42	c	ac, c	6	—	0	0
	M46	c	c	2	b	1	0
	M49	ac	c	5	b	1	0
	M55	bc	bc, c	4	—	0	6
	M57	c	c	1	—	0	5
	M58	c	bc	2	—	0	4
	M59	c	ac, c	6	—	0	0
	M60	bc	a'c, ab, ac, b, bc, c	45	—	0	5
	M62	ab	—	0	b	4	1
	M64	bc	ab, ac, b, bc, c	6	—	0	1
	Feijoas	F04	c	ac, bc, c	10	—	0
F05		c	c	5	b	1	0
F08		c	c	7	—	0	0
F09		bc	ac, c	2	—	0	0
F21		b	b, bc	2	c	2	6
F23		c	bc, c	3	b	1	4
F29		c	c	4	—	0	2
F31		c	bc, c	6	—	0	0
F32		c	ac, bc, c	10	—	0	0
Alfaiates	A04	c	bc, c	8	a	1	1
	A08	c	a'c, ac, bc, c, cd	33	—	0	1
	A11	c	c	2	—	0	2
	A21	a	a'a, a, ab, ac	12	a'c, bc, c	27	4
	A26	ac	ac, bc, c	5	b	1	0
	A31	c	a'c, ac, bc, c, cd	21	ab, b	6	2
	A33	bc	ac, c	2	—	0	0
Outeiro	A36	c	a'c, ac, bc, c	36	—	0	1
	SM1	ad?	a, ac, ad, bd, cd, d	38	—	0	3
	SM2	d	cd, d	41	—	0	4

Teve de aplicar-se o procedimento inverso para deduzir o fenótipo PGM provável de SM1, que não foi visualizado em gel apesar das tentativas feitas com dois extractos desta árvore: postulando que teria uma actividade do gene proveniente de sobreiro (d) e outra das que se podem observar em azinheira, a única compatível com o conjunto de zimogramas dos seus descendentes era a, assim assumindo-se o fenótipo

ad para SM1.

Na tabela 4.10 resumem-se as observações realizadas. Apenas em 14 das 37 famílias se detectaram contradições entre as duas gerações, interpretando-se como contaminantes os casos de plantas jovens contraditórias, isto é, provenientes doutra árvore. De 441 observações, 55 foram assim consideradas (12,5% das amostras classificáveis, ou 13,6% de 403, se não se contar com as descendências de SM1), donde perto de metade estavam etiquetadas para uma só família (da árvore 21 de Alfaiates), onde aliás a maioria dos casos são de contaminação — no entanto, se por hipótese a árvore 21 de Alfaiates fosse ac e não a (possível caso a banda c fosse muito ténue, o que *a posteriori* não foi verificado), então todas as plantas consideradas contaminantes seriam verdadeiros descendentes, e a fracção de contaminantes (que não é forçosamente o complementar da especificidade deste marcador, cf. Parte III secção A) poderia baixar para 6,3%. Note-se, no entanto, que só com 1 *locus* polimórfico as estimativas de contaminantes terão de ser por defeito.

Em qualquer caso, pode considerar-se que o conjunto dos resultados da tabela 4.10 apoia claramente a hipótese enunciada; assim, no presente trabalho o *locus* para as actividades PGM detectadas nas folhas é designado *Pgm*, e os alelos para as diferentes posições no zimograma numerados do ânodo para o cátodo, isto é, *Pgm*<sup>1</sup> para a actividade a', *Pgm*<sup>2</sup> para a actividade a, e assim sucessivamente até *Pgm*<sup>5</sup> para a actividade d.

#### *PGI (sobreiros)*

O facto de geralmente só se encontrem combinações de 2 actividades polimórficas (a e b) em cada gel revelado para PGI em sobreiros não permite testar a hipótese que foi colocada nas descendências atribuídas a árvores ab. Mas essa hipótese, que estes isoenzimas PGI são homodiméricos, codificados num único *locus* codominante, e onde os heterozigóticos produzem 3 bandas (figuras 2.10b e 2.11b), sustenta-se também em trabalhos anteriores que a utilizaram para material foliar [von Wühlisch & Nóbrega 1995, Gehle 1999, e ainda Toumi & Lumaret 1998, Michaud *et al.* 1995]. Usando esta hipótese, das 20 famílias atribuídas a árvores aparentemente homozigóticas (zimogramas PGI a ou b), 5 apresentaram contaminantes (que eram 3,1% do total das plantas jovens analisadas).

A mesma hipótese deverá ser válida para azinheiras [Michaud *et al.* 1995] e para os híbridos, mas como referido anteriormente apenas se registou se eram ou não discriminantes em relação a sobreiro, não sendo

possível identificar os diferentes alelos.

#### *PGD (azinheiras e híbridos)*

Interessava verificar se o único polimorfismo frequente, o do aparecimento da banda b discriminante em relação a sobreiro, seria interpretável geneticamente, tendo em conta que as actividades PGD em *Quercus robur* são homodiméricas, codificadas num *locus* cada uma [von Wühlisch & Nóbrega 1995, Gehle 1999]. O padrão de 3 bandas esperado para heterozigóticos raramente se observou (foi mais fácil de observar nas muito intensas actividades extraídas de sementes, daí que fosse classificado diferentemente, “12hz” em vez de “12+b”), mas a única árvore “12+b” que produziu descendência foi o híbrido SM1, onde se contou apenas 1 planta descendente com o zimograma “12+b”, contra 15 que foram “12”, enquanto das 6 sementes observadas houve 4 classificadas como “12hz”, 1 como “12+b”, e 1 como “12–”. Face a estes resultados, não foi possível tirar quaisquer conclusões sobre a interpretação genética deste polimorfismo.

## **C — Sinopse**

1. Identificaram-se 8 actividades enzimáticas que, após análises de rotina em amostras de folhas e sementes dos povoamentos de referência, mistos e nos híbridos, se demonstraram capazes de contribuir para a discriminação entre sobreiros, azinheiras e seus híbridos: no sistema C, DIA e MDH; no sistema H, GsR, PGM e PGD; no sistema R, PGI e EST.
2. Outras actividades que parecem ter o mesmo potencial, mas carecem de confirmação em análises de rotina: no sistema C, EST; no sistema R, GDH (só em sementes); no sistema 9, ACP-F.
3. Identificaram-se polimorfismos intra-específicos em todas as actividades mencionadas no ponto 1 e ainda em PER e talvez ADH (sistema C), SKD (sistema H), SOD (sistema R) e talvez IDH (sistema 4).
4. Conseguiram-se interpretações genéticas para os polimorfismos em DIA, GsR, PGM, PGI e (em parte) para MDH.

## **Parte III: Aplicações**

Feita a descrição dos marcadores isoenzimáticos desenvolvidos, em termos de variação dos zimogramas, limitações de revelação e também,

nalguns casos, da respectiva hereditariedade, torna-se possível aplicá-los à investigação de diversas questões, com as amostragens feitas.

## A — Detecção de contaminantes

Como referido na secção anterior, o recurso a hipóteses genéticas plausíveis sobre a hereditariedade dos marcadores polimórficos, seja a nível interespecífico como intra-específico, permite identificar indivíduos cuja etiquetagem é errada. As causas possíveis para a ocorrência de indivíduos erroneamente etiquetados, dentro do esquema de amostragem adoptado, são essencialmente três:

i) intrusão de sementes de origem diversa antes da sua colheita, deslocadas após a sua queda ao solo por acidentes do terreno, acção de animais ou outros agentes (contaminantes *in situ*);

ii) erros de etiquetagem no processo de sementeira, no período de crescimento em viveiro, ou no processamento para análise isoenzimática (contaminantes *ex situ*);

iii) erros no registo dos zimogramas.

A utilização de fotografias legendadas permitiu corrigir *a posteriori* alguns casos de erro do terceiro tipo, e o registo da morfologia das plantas no acto de colheita de amostras de folhas permitia prever em que casos se encontraria um zimograma contraditório com a espécie implícita na etiqueta. De resto, só com os zimogramas se pôde ter alguma noção sobre a extensão das contaminações, a qual, como já referido a propósito dos resultados da tabela 4.10, pelas limitações inerentes aos marcadores enzimáticos utilizados, ainda assim tem de entender-se por defeito. A tabela 4.11 resume a evidência obtida para os contaminantes *in situ*.

Tabela 4.11 — Incidência de contaminantes *in situ* durante o presente estudo. Entre parêntesis, dimensão da amostra para cada caso. Os contaminantes interspecíficos referem-se à presença de plantas duma espécie dispersas entre a amostragem doutra espécie, e os marcadores intra-específicos (PGI em sobreiro e PGM em azinheira) à detecção de contaminantes pela incongruência entre os genótipos das plantas jovens e os das árvores às quais era atribuída a sua origem materna.

	Mitra		Feijoas		Alfaiates		Global	
Contaminantes interspecíficos	0,0%	(351)	1,1%	(282)	1,4%	(554)	0,9%	(1187)
Marcadores PGI (sobreiro)	1,9%	(53)	2,2%	(46)	3,8%	(160)	3,1%	(259)
Marcadores PGM (azinheira)	8,1%	(223)	4,4%	(90)	19,3%	(181)	11,5%	(494)



Conforme sugerido na secção anterior, é possível que a estimativa de contaminantes entre azinheiras no povoamento de Alfaiates esteja inflacionada por um erro de classificação da árvore 21, onde ocorreram cerca de metade do total de contaminantes desta espécie. Admitindo a hipótese desta azinheira ser ac, a percentagem em Alfaiates baixa para 4,4% e a global para 6,1%.

A detecção de contaminantes *in situ* interspecíficos contrasta pela prevalência muito mais baixa; e a distribuição desses 11 contaminantes também foi heterogénea: 8 eram azinheiras dispersas na amostragem da árvore 20 do povoamento de Alfaiates (sobreiro), aliás vizinha da 21 (azinheira), ambas situadas no sopé da encosta onde assenta este povoamento (cf. “Materiais e Métodos” parte II secção A1, e Apêndice I secções A1 e B3); as outras 3 eram de Feijoas, 2 sobreiros e 1 azinheira, em 3 famílias diferentes.

Em termos de contaminantes *ex situ*, houve 4 caixas que eram compostas por sobreiros, mas cuja etiquetagem se referia a uma azinheira. Todas foram recebidas com a derradeira remessa de plantas, com sinais de ter havido colocação de novas etiquetas identificadoras, o que é sugestivo de ser uma troca ocorrida já após as sementeiras, em fase tardia da sua manutenção no viveiro.

Também num dos povoamentos de referência se registou 1 planta contaminante de azinheira (amostra 20Q) no de Santiago do Cacém.

## B — Hibridismo

Entre os adultos observados, os únicos híbridos foram aqueles que já estavam referenciados como tal antes de serem analisados (tabela 4.12):

Em todos se verificaram zimogramas DIA, MDH (ânodo e cátodo) e GsR híbridos. Já a análise para a actividade PGM trouxe 2 problemas: apesar da repetida amostragem em vários casos, só foi observada directamente em 2 híbridos (e indirectamente num terceiro, graças às distribuições na descendência); e na árvore SM2 o fenótipo é idêntico ao dos sobreiros, o que foi confirmado pela observação da respectiva descendência (tabela 4.10). Pode assim tratar-se dum descendente de híbrido, a exemplo dos que foram observados no presente estudo (cf. parte D deste capítulo), ou então, se for um verdadeiro híbrido, o gâmeta de azinheira que lhe deu origem teria sido portador do alelo raro *Pgm*<sup>5</sup>. Finalmente, pode verificar-se que os marcadores menos específicos (PGD, PGI e EST), em conjunto, permitiriam distinguir 8 destes híbridos dos sobreiros (a excepção foi CAB).

Tanto em folhas como em sementes, nenhum híbrido foi observado. A única conclusão que se pode tirar, qualquer que seja o conjunto de amostras que se considere, é que a probabilidade de incidência de híbridos é majorada pelo valor P, tal que  $NP < -\log_e(1 - \alpha)$ , em que N é o número de indivíduos analisados e  $\alpha$  a probabilidade de obter pelo menos 1 híbrido (distribuição de Poisson). Na tabela 4.13 listam-se os valores estimados, considerando apenas os conjuntos onde se fez análise de folhas, visto que a amostragem de sementes foi muito limitada.

Tabela 4.12 — Fenótipos isoenzimáticos dos híbridos analisados no presente estudo.

Árvore	Amostras	DIA	MDH	GSR	PGM	PGD	PGI	EST	Comentários
ALC	X24	X	X(X)	X		12	Az+b	12	extracção 41
CAB	X25	X	X(X)	X			+	2	extracção 41
MRM	X10, X27	X	X(X)	X		12	Az	12	amostra X10 deu Az em DIA; extracções 28 e 42
SES	X4, X8, X13, X20	X	X(X)	X		12	Az	12	extracções 0, 7, 28 e 39
SM1	X2, X15, X22	X	X(X)	X	(ad)	12+b	+	2	amostra X15 deu 12 em EST; fenótipo PGM deduzido a partir da descendência (tabela 4.10); extracções 0, 31, 39
SM2	X3, X16, X23	X	X(X)	X	d	12	Az	2	extracções 0, 31, 39
SM3	X5, X17	X	X(X)	X	cd	12+b	Az	2	extracções 7, 31
SM4	X14, X21	X*	X(X)	X		12	Az	12	extracções 28 e 39
VR	X26	X?	X(X)	X		12	Az+b	2	extracção 41

Tabela 4.13 — Cálculo do majorante da probabilidade P de incidência de híbridos nos povoamentos mistos estudados, para níveis de erro  $\alpha$  de 5%, 10% e 20%, com base nas observações em plantas germinadas de sementes dos três povoamentos. Excluem-se apenas as que pertencem a caixas cuja etiquetagem era errada (contaminantes *ex situ*).

Espécie	Frutificação	Local	N	P		
				$\alpha = 5\%$	$\alpha = 10\%$	$\alpha = 20\%$
Azinheiras	1997	Mitra	75	<0,068%	<0,140%	<0,298%
		Mitra	223	<0,023%	<0,047%	<0,100%
	1998	Feijoas	91	<0,056%	<0,116%	<0,245%
		Alfaiates	211	<0,024%	<0,050%	<0,106%
		Global	525	<0,010%	<0,020%	<0,043%
Sobreiros	1998	Mitra	116	<0,044%	<0,091%	<0,192%
		Feijoas	179	<0,029%	<0,059%	<0,125%
		Alfaiates	343	<0,015%	<0,031%	<0,065%
		Global	638	<0,008%	<0,017%	<0,035%
Ambas	1998	Mitra	339	<0,015%	<0,031%	<0,066%
		Feijoas	278	<0,018%	<0,038%	<0,080%
		Alfaiates	554	<0,009%	<0,019%	<0,040%
		Global	1163	<0,004%	<0,009%	<0,019%

As estimativas de  $P$ , muito baixas para cada espécie em cada povoamento misto em função dos valores de  $N$  deste estudo, podem ser majoradas por um valor tão baixo quanto 0,004% ( $\alpha = 5\%$ ), considerando uniformidade entre povoamentos e entre espécies. Mesmo relaxando o nível de erro  $\alpha$  para 10% ou 20%, a estimativa permanece bastante baixa: como exemplo, e admitindo que as azinheiras são as mais prováveis receptoras na hibridação, o majorante de  $P$  situa-se em 0,043% com  $\alpha = 20\%$  (o que se presume dar uma margem bastante confortável em relação ao valor real).

## C — Introgessão

Considerando como modelos de referência as espécies “puras” e os híbridos, os casos que apresentem combinações de fenótipos enzimáticos dos diferentes modelos foram tratados *a priori* como exemplos possíveis de introgessão.

### 1) Povoamentos mistos e de referência

Houve 6 amostras de árvores adultas consideradas ambíguas pelo conjunto de resultados obtido, 3 das quais (amostras 1L, 2G e 2N) devido a erros de avaliação dos zimogramas EST e MDH, numa fase muito precoce do trabalho, e que foram esclarecidos em novas amostragens. As outras referem-se a 3 azinheiras, a árvore 30 do povoamento de Feijoas, cuja PGM era bd, e as árvores 11 e 36 do povoamento de Alfaiates, que são DIA “X”, e das quais parte da descendência era do mesmo fenótipo — isto é, como os híbridos em DIA mas típico das azinheiras em todos os outros marcadores analisados. Em ambas as situações poderá persistir a dúvida entre tratar-se de introgessão dum gene de sobreiro e a ocorrência dum alelo raro de azinheira. No caso da banda  $\underline{d}$  de PGM, a sua ocorrência nas descendências de Testa, Azeiteiros e Alfaiates (cf. secção E) é consistente com a existência dum alelo raro de azinheira que codifica uma actividade de comigra com a de sobreiro. Alternativamente, considerar-se-ia uma introgessão do alelo de sobreiro, e no caso de Alfaiates (dado que a banda  $\underline{d}$  não foi observada em nenhum dos adultos) transmitido por via polínica.

A evidência de aparente introgessão do gene para DIA de sobreiro pode ser avaliada nas linhagens das árvores 11 e 36 de Alfaiates, sob o ponto de vista da hipótese genética enunciada na secção B1, em que se prevê que metade dos descendentes seja portador do gene de sobreiro e assim apresentem o zimograma “X”. Na tabela 4.14 resume-se a informação disponível e o resultado do teste estatístico correspondente.

Conclui-se que pelo menos em A36 há um desvio significativo entre as ocorrências observadas e os valores esperados pela hipótese genética enunciada na secção B1, o que não a invalida forçosamente, pois pode dever-se a selecção negativa sobre as plantas com DIA “X” (pode também dever-se à existência de contaminantes não detectados, apesar da expressão da PGM não evidenciar nenhum nestas descendências, cf. tabela 4.10).

Tabela 4.14 — Expressão de DIA como zimograma “X” nas descendências das árvores 11 e 36 de Alfaiates. A coluna de probabilidade refere-se à estatística  $\chi^2$  (1 g.l.) com hipótese nula de 50% de descendentes expressando esse zimograma. O teste de homogeneidade entre as descendências deu  $\chi^2 = 0,64$  (P = 0,42, 1 g.l.).

Descendência	Total	Observados	Esperados	$\chi^2$	P
A11	14	6	7,0	0,07	0,79
A36	37	10	18,5	6,92	0,009
A11+A36	51	16	25,5	6,35	0,012

Houve ainda 8 plantas provenientes dos povoamentos mistos com zimogramas ambíguos, das quais há a salientar 1 caso (amostra 37az pertencente à amostragem de 10 elementos atribuídos à azinheira 9 de Feijoas) onde a PGI foi classificada como “Az+b”, enquanto os marcadores DIA e MDH (anódico) eram “Az”. Excluindo a possibilidade de tratar-se dum contaminante doutra família, e visto que nenhum outro membro desta família apresenta esta banda PGI lenta, deduz-se que é um alelo transmitido por via paterna; e nessa, pode considerar-se a hipótese de introgressão (pois aparenta ser idêntica à banda b de sobreiro) ou duma actividade de azinheiras mais lenta (cf. tabela 4.8, figura 4.7 b).

Mais difíceis de explicar são 2 amostras (38c e 38i) atribuídas à árvore 19 da Mitra, cujo zimograma PGM é d. A árvore M19 tem zimograma PGM “ac” e por isso podem tratar-se de contaminantes intra-específicos, mas em todo o caso o restante dessas duas amostras é típico de azinheira. Houve ainda 2 amostras de sobreiros contíguas no mesmo gel (33Y e 33Z) que deram um zimograma PGI “a+b”, isto é, com as bandas a e b mas sem a banda intermédia característica dos heterozigóticos, tratando-se provavelmente de contaminação mútua, durante a colocação destas amostras no gel, entre uma de zimograma a e outra de zimograma b. Os restantes casos em povoamentos mistos prendem-se com a detecção da banda 1 de EST em sobreiros, mas pode tratar-se de erros de visualização numa fase relativamente precoce do trabalho.

Os restantes casos de ambiguidade de identificação provieram quase todos do povoamento de referência (sobreiros) de Santiago do Cacém, 20

no total, dos quais 17 dizem respeito à detecção da banda 1 em EST, todos numa fase relativamente precoce do trabalho e que talvez se possam atribuir a erros de visualização. Mais complexos, mas instrutivos, são os outros 3 casos, e ainda um (amostra 18r) do povoamento de referência Azeiteiros (tabela 4.15).

Tabela 4.15 — Fenótipos isoenzimáticos de 4 plantas consideradas de identidade ambígua, provenientes de povoamentos de referência. Na coluna PER, os fenótipos são banda 1 (presença ou ausência) / região 2 (variantes 0 e \*, cf. figura 4.11). No texto refere-se ainda a actividade ACP-F (sistema 9) da amostra 20K.

Amostra	DIA	MDH	PER	PGI	EST	GSR	PGM	PGD
15U	X	Sb(Az)	+/0	Az	12	Sb	ac	12
18r	Az	X?	-/0	+	123	Az	ac	12
20K	Az	Sb(Sb)	-/0	b	2	Sb	d	12
30AB	X	Sb(Sb)	-/0*	b	2	Sb	d	

A amostra 15U, que tinha aspecto de azinheira, apresentou uma mistura de caracteres de sobreiro (MDH anódica, GsR), de azinheira (MDH catódica, PGI, EST e PGM) e de híbrido (DIA) que sugerem tratar-se dum caso de introgressão. Infelizmente, não foi possível reamostrar esta planta porque morreu depois de ser devolvida ao viveiro.

A actividade MDH anódica da amostra 18r foi considerada híbrida antes de ser conhecido o padrão “X” através dos híbridos, mas ao contrário destes apresentou-se difusa — e a ausência de banda 1 em PER contribuiu na altura para classificar esta amostra como ambígua; é possível, por isso, que essa avaliação fosse incorrecta e não haja introgressão neste caso.

As amostras 20K e 30AB, finalmente, apenas diferem do padrão de sobreiro pelo zimograma DIA, e, enquanto 30AB se assemelha à situação de introgressão proposta para as famílias 11 e 36 de Alfaiates (mas desta vez em sobreiro), 20K chega a apresentar o zimograma “Az” (e a actividade ACP-F, no sistema 9, migrou para uma posição intermédia entre sobreiros e azinheiras no mesmo gel). Situação análoga à da 20K, no que respeita ao zimograma DIA, foi observada em sobreiros preguntos da Herdade de Montinho, como se detalha a seguir.

## 2) Preguntos

Dos 3 povoamentos onde foi feita uma amostragem de sobreiros de cortiça preguenta, apenas no da Herdade de Montinho se detectaram zimogramas que podem ser indicadores de introgressão de genes de azinheira. Essa evidência resume-se essencialmente ao marcador DIA,

que em cinco árvores era “X” (árvores 2, 11, 12, 13, 19) e em duas era “Az” (números 15 e 18); uma segunda amostra de folhas foi colhida das árvores 11, 12 e 13, e confirmou esta observação. Todas estas árvores (excepto a número 2) são vizinhas entre si, ocupando, com outras aparentemente normais (números 14, 16, 17, 20 e 21, além de mais 4 próximas da número 18), uma área que não excede a de um quadrado com 50 metros de lado (cf. Apêndice I secção B4); este padrão de distribuição, e se se tratar de regeneração natural, sugere que estas árvores são aparentadas entre si por via materna.

Outro facto a assinalar nos sobreiros destes 3 povoamentos é a elevada proporção (22 a 27, num total de 45 amostras) dos que apresentavam a banda PER 1, o que é atípico da espécie (cf. tabela 4.5).

### 3) Desempenho dos marcadores isoenzimáticos nas análises de rotina

A tabela 4.16 resume o desempenho de cada uma das actividades analisadas em larga escala, de modo a permitir compará-las entre si em termos de consistência, especificidade e sensibilidade.

Tabela 4.16 — Percentagem de análises identificativas (consistência), especificidade e sensibilidade de cada um dos marcadores isoenzimáticos utilizados em larga escala no presente estudo (excluindo apenas as amostragens selectivas de sobreiros preguentos), referidas à possibilidade de detecção de hibridismo em sobreiros. Consistência abrange todas as análises, especificidade e sensibilidade apenas se refere à perspectiva de análise em sobreiros.

Sistema	Marcador	Número de amostras	Consistência	Especificidade	Sensibilidade
C	DIA	2242	96,2%	100%	100%
C	MDH	2290	98,2%	100%	100%
C	PER	2199	100,0%	83,9%	98,8%
H	GsR	1591	70,6%	100%	100%
H	PGM	1861	84,3%	100%	99,7%
H	PGD	1934	85,8%	100%	12,2%
R	PGI	2146	93,2%	100%	80,6%
R	EST	2138	90,5%	100%	92,4%

Os valores em PER referem-se apenas à banda 1. A quebra de especificidade em PGM deve-se à ocorrência de 2 azinheiras (amostras 38c e 38i) com zimograma d. A sensibilidade em PGD refere-se às azinheiras com banda b, em EST às que apresentaram banda 1 (que baixa para 48,6% nas descendências de híbridos, mas a expectativa seria 26,0%,  $\chi^2 = 36,0$ , 1 g.l.,  $P = 2 \times 10^{-9}$ ). Quanto à sensibilidade em PGI, refere-se

a todas as azinheiras (plantas e sementes) que não eram “+”, mas há desvios importantes em relação a este valor global: nos povoamentos mistos esta sensibilidade foi de 84,4% em Alfaiates, 94,3% em Feijoas e 84,9% na Mitra; nos de referência foi mais baixo: 76,4% em Azeiteiros e 76,9% em Testa; e nas descendências de híbridos, como seria de esperar<sup>1</sup>, ainda mais baixo: 63,2%. A consistência de PGM difere entre sobreiro (88,8%) e azinheira (79,0%), devendo talvez *a priori* assumir-se o valor desta espécie como aplicável aos híbridos e suas descendências.

## D — Descendências dos híbridos

Consideram-se separadamente os resultados obtidos com plantas criadas em viveiro a partir de sementes produzidas pelos híbridos SES, SM1 e SM2, onde a dimensão da amostragem pode considerar-se mais ou menos satisfatória, e os obtidos em sementes colhidas em 2000 destes híbridos e ainda de CAB, MRM e VR, ainda muito preliminares pelo reduzido número de plantas e pela interpretação dos zimogramas ser menos segura.

### 1) Plantas

Consideraram-se primariamente os zimogramas DIA, MDH (anódico), MDH (catódico), GsR e PGM, que formavam o conjunto com maior sensibilidade na tarefa de discriminar entre sobreiro, azinheira e híbrido, recorrendo-se ainda às actividades PGI, EST e PGD quando estas pudessem trazer um esclarecimento suplementar. A amostra 38.29 (de SES) não deu qualquer zimograma, possivelmente por ter havido degradação dos enzimas, e das outras 104 amostras apenas 3 de SM1 foram consideradas contaminantes por serem indistinguíveis de sobreiro (38.16) ou de azinheira (33.4 e 38.21). Mas não se pode excluir que sejam na verdade material introgredido, e assim deduz-se que a metodologia utilizada teve cerca de 97% de sensibilidade para a detecção do fenótipo de descendentes dos híbridos. É um valor muito alto, com tão poucos marcadores diagnosticantes.

Das 101 plantas que se passa a considerar, todas de alguma maneira

<sup>1</sup> O produto da frequência de *Pgi-B*<sup>1</sup> (média entre o conjunto dos povoamentos mistos e o de referência, 0,6233) pela raiz quadrada da frequência de azinheiras “+” (plantas dos povoamentos mistos e de referência, 0,4404) dá uma previsão de ocorrência de 27,5% de híbridos “+” na F<sub>1</sub>, e 30,2% na F<sub>2</sub> tendo em conta as frequências dos diversos tipos de pólen estimadas para o conjunto dos 3 híbridos, tabela 4.18; este último valor, correspondente a uma sensibilidade de 69,8%, não se desvia significativamente do de 63,2% observado ( $\chi^2 = 0,90$ , 1 g.l., P = 0,34).

sugeriam a sua origem híbrida, porque pelo menos um dos marcadores era como nos híbridos. No caso das actividades MDH anódicas, houve casos que apresentaram padrões de bandas desconhecidos quer nas espécies de referência, quer nos híbridos, o que sugeria serem novos recombinantes ( $Az^{\wedge}$  e  $X^{\wedge}$  cf. parte II, secção B1).

Foi possível determinar a origem do pólen para a maior parte destas plantas: as que apresentavam um ou mais marcadores de sobreiro iria indicar que o pólen que lhe dera origem era dessa espécie, e do mesmo modo para pólen de azinheira caso houvesse um ou mais marcadores desta espécie; mas já quando se encontram no mesmo indivíduo marcadores de sobreiro e de azinheira, a única hipótese a considerar será que o pólen era recombinante, provavelmente do próprio híbrido (autopolinização); quando todos os marcadores presentes eram como a árvore que lhes deu origem, ou quando os zimogramas PGM implicavam dúvidas sobre a origem do pólen, esta ficou indeterminada. Na tabela 4.17 exemplifica-se o processo de determinação da origem do pólen, e na tabela 4.18 faz-se um resumo dos resultados obtidos.

Tabela 4.17 — Exemplos de plantas descendentes de híbridos de sobreiro e azinheira, com a dedução da origem provável do pólen que deu origem a cada uma, com base nos seus fenótipos isoenzimáticos (sublinhados os mais importantes para a determinação da origem do pólen). Na 3ª coluna inserem-se os zimogramas PGM e PGD das árvores. Identificação da origem do pólen (última coluna): S — sobreiro; A — azinheira; X — recombinante; ? — indeterminado.

Amostra	Árvore	PGM, PGD	DIA	MDH+	MDH-	GSR	PGM	PGD	PGI	EST	pólen
38.26	SES	?, 12	Sb	Sb			d	12	+	<u>12</u>	S
33.16	SM1	(ad), 12+b	<u>Sb</u>	X'	<u>Sb</u>	<u>Sb</u>	ad		Az	2	S
34.30	SM2	d, 12	Sb	Sb	Sb		d		<u>Az</u>	2	S
36.13	SM2	d, 12	<u>Sb</u>	X'		<u>Sb</u>	<u>d</u>		Az	2	S
36.4	SM2	d, 12	X	X'		X'	<u>d</u>		+	2	S
33.5	SM1	(ad), 12+b	<u>Az</u>	X		<u>Az</u>	<u>bd</u>		+	12	A
34.26	SM2	d, 12	<u>Az</u>	X'	X				+	12	A
38.27	SES	?, 12	<u>Az</u>	<u>Sb</u>	<u>Sb</u>		cd	12	+	12	X
38.3	SM1	(ad), 12+b	X	<u>Sb</u>	<u>Sb</u>	<u>Az</u>	<u>d</u>		+	12	X
38.8	SM1	(ad), 12+b	X	X			ad	<u>1+2</u>	Az	23	?
34.23	SM2	d, 12	X	X'	X				+	2	?

Os 4 casos indeterminados pela aparente contradição entre PGM e os outros marcadores foram a amostra 38.14 de SM1 (assumindo-se este híbrido como ad) e as amostras 34.20, 34.24 e 34.27 de SM2. Tendo em conta a presumível tendência para a actividade MDH catódica aparentar “Sb” quando na realidade será “X” (conforme se documenta na parte II secção A1, e é discutido no próximo parágrafo), pode admitir-se que em



38.14 e 34.20 o pólen fosse de azinheira. Em qualquer caso, as estimativas da última linha da tabela 4.18 não seriam alteradas substancialmente. Apenas a de SM2 se desvia significativamente de 50% ( $\chi^2 = 11,3$ , 1 g.l.,  $P = 8 \times 10^{-5}$ ), mas em SES a ausência de pólen de azinheira (aliás a espécie predominante na vizinhança desta árvore!, cf. “Materiais e métodos” parte I secção C) contrasta com o que se esperaria caso este híbrido tivesse igual receptividade ao pólen das duas espécies; no entanto, não parece tratar-se duma diferença de receptividade, pelo menos a avaliar pelos resultados com sementes de 2000 (cf. secção 2).

Tabela 4.18 — Origem provável do pólen que interveio nas descendências (plantas) dos híbridos SES, SM1 e SM2. A percentagem de pólen de sobreiro é referente ao total, sem incluir os indeterminados.

pólen	SES	SM1	SM2	todos
sobreiro	11	15	33	59
azinheira	0	18	5	23
recombinante	6	2	2	10
indeterminado	1	3	5	9
% sobreiro	65%	43%	83%	64%

Considerando a origem provável do pólen de que descende cada planta, é possível determinar o genótipo do seu complemento feminino, isto é, do gâmeta recombinante produzido pelo híbrido. O principal interesse desta determinação é verificar a predição de que, para cada *locus*, metade dos gâmetas femininos produzidos pelos híbridos foi portador do alelo de sobreiro, e a outra metade do alelo de azinheira. Enquanto para DIA, MDH (anódico) e PGM<sup>2</sup> a percentagem de gâmetas portadores de alelo de sobreiro estava muito próxima da expectativa (48–52%), para GsR era ligeiramente inferior mas não significativa (39%; teste  $\chi^2$ , 1 g.l.:  $P = 29,6\%$ ), mas havia um desvio altamente significativo para MDH– (65%;  $P = 0,77\%$ ).

É provável que o desvio em MDH– se relacione com problemas de visualização, em que um zimograma “X” seja interpretado como “Sb” (cf. parte II, secção A1); sete casos são dignos de nota pela implicação que neles tem esta hipótese: nas amostras 7AB, 33.2, 33.9, 33.10 e 38.5, porque a determinação da origem do pólen se decidiu em função dos zimogramas MDH–, e nas amostras 38.14 e 34.20 porque os respectivos zimogramas PGM eram contraditórios com o genótipo da respectiva

<sup>2</sup> No caso de PGM, a estimativa baseia-se sobretudo nos resultados com SM1

árvore-mãe, como já referido acima junto com as amostras 34.24 e 34.27. Porém, efectuando a substituição de “Sb” por “X” nesses 7 casos, o desvio continua a ser significativo (64%;  $P = 1,01\%$ ).

Um teste complementar baseia-se na expectativa de 50% de zimogramas híbridos nos descendentes em cada um dos *loci* com genótipo híbrido em SES, SM1 e SM2, independente das frequências de pólen “Sb”, “Az” ou “X”. Descontando-se uma minoria de casos duvidosos, observaram-se 47 em DIA (esperados 49), 47 em MDH+ (incluindo as variantes X, X<sup>^</sup>, X' e X<sup>^</sup>', esperados 48,5), 17 em MDH– (esperados 30), 18 em GsR (X e X', esperados 18) e 25 em PGM (ad, bd e cd, apenas os descendentes de SES e SM1, esperados 22,5); mais uma vez, apenas o caso de MDH– se desviou significativamente da expectativa ( $\chi^2 = 10,42$ ,  $P = 0,125\%$ ), que confirma a interpretação dum défice de visualização da banda “Az” deste marcador.

Antes ou durante a maceração das folhas destas plantas verificou-se que algumas (8 descendentes de SM1 e 3 de SM2) tinham características das folhas de azinheira (maior consistência ou textura mais fibrosa); e houve pelo menos 2 (de SM1) cujo contorno espinulado das folhas as assemelhavam às folhas de azinheira, embora não na consistência ou na textura na maceração. Em todos estes casos o pólen que lhes deu origem terá sido, com base nos fenótipos isoenzimáticos que apresentaram, de azinheira (perto de metade, considerando as estimativas da tabela 4.18).

O exame dos haplótipos supostos para os *loci* codificando DIA, MDH+ e PGM, com vista a determinar se haveria ligação cromossómica entre eles, não foi considerado conclusivo.

O número médio de marcadores híbridos apresentados por cada amostra aumentou com o número de zimogramas específicos revelados, numa proporção média próxima de  $\frac{1}{2}$ . Verificou-se que a situação observada em SM2, onde apenas 4 dos 5 marcadores revelados eram de híbrido, ocorreu também em dois dos descendentes de SM1, indo assim ao encontro da suposição feita anteriormente de que SM2 não é um descendente directo de sobreiro com azinheira.

## 2) Sementes

Consideraram-se separadamente os zimogramas DIA, MDH (anódico) e GDH, embora com sérias reservas quanto à fiabilidade de DIA (não exibiu “X” nas descendências dos híbridos<sup>3</sup>) e quanto à classificação em

<sup>3</sup> O facto de haver 2 sementes colhidas em A11 que deram “X” em DIA levanta a questão sobre se nestes o genótipo é o mesmo que nos híbridos.

padrões de sobreiro (banda S) azinheira (banda F) e híbrido (bandas F e S) de GDH. A determinação da origem dos grãos de pólen foi feita para 6 híbridos (SES, SM1, SM2, CAB, MRM, e VR), mas apenas com 6 sementes de cada um (tabela 4.19).

As dúvidas ainda existentes sobre a hereditariedade dos marcadores GDH leva a que se considere a identificação de origem “X?” como duvidosa; porém, se se confirmar que é de facto pólen “X”, a taxa de autopolinização dos híbridos, detectada neste ponto do ciclo de vida, é bastante elevada (6+7 = 13 num total de 36, isto é, 36% do total).

No que respeita à proporção estimada de gâmetas femininos dos híbridos portadores do alelo de sobreiro em cada *locus* suposto, foi de 68% em DIA e 58% em MDH (ambos sem desvio significativo da expectativa de 50%), mas de 23% em GDH ( $\chi^2 = 7,5$ , 1 g.l., P = 0,6%). Tabela 4.19 — Origem presumível do pólen que interveio nas descendências (sementes) dos híbridos. Nas amostras onde o aparecimento dum zimograma (DIA ou MDH) de sobreiro e do zimograma “F” em GDH (que se supõe provisoriamente ser de azinheira), a classificação do pólen como sendo recombinante é feita sob reserva, daí ser apresentada separadamente, como “X?”.

pólen	CAB	MRM	SES	SM1	SM2	VR	total
sobreiro	1	2		3	1	3	10
azinheira	3	1	6	1	1	1	13
recombinante	1			1	2	2	6
X?	1	3		1	2		7

É ainda de notar em SES uma tendência marcada para pólen de azinheira, quando a nível de plantas jovens, na frutificação de 1998, nenhum caso foi detectado (tabela 4.18).

Quanto à ausência de zimogramas “X” em DIA, é possível que apenas um dos alelos esteja a ser expresso nas sementes, e no caso de ser consistente em termos de origem (materna ou paterna) pode tratar-se do fenómeno epigenético de *imprinting* [Alleman & Doctor 2000]. Na hipótese de ser sempre o alelo materno para DIA que é expresso nestas sementes, procurou-se uma redefinição da origem do pólen com base nos zimogramas MDH e GDH apenas, mas sem progressos em relação ao que é apresentado na tabela 4.19. É fundamental, para esclarecer estas questões em sementes, que a variação interespecífica para PGM e GsR seja clarificada.

## E — Frequências intra-específicas

### 1) Povoamentos mistos (adultos) e de referência (plantas jovens)

#### Locus Pgm (azinheiras)

Na tabela 4.20 apresentam-se as frequências dos 5 alelos identificados no presente estudo nas azinheiras das populações de referência (plantas jovens) e montados mistos (adultos).

A análise das distâncias genéticas de Nei, neste *locus*, sugere que as azinheiras de Azeiteiros se diferenciam mais do que as dos povoamentos mistos e de Testa (entre Feijoas e Alfaiates com um valor bastante baixo  $D = 0,0025$ ). O valor de  $G_{ST}$  entre os 3 povoamentos mistos situou-se em 1,23%, sugerindo uma baixa diferenciação populacional, corroborada pelo teste através duma tabela de contingência, que deu  $\chi^2 = 3,42$  (4 g.l. juntando os alelos 1, 2 e 5 numa só classe,  $P = 0,49$ ), donde se conclui que as frequências neste *locus* são homogêneas entre os 3 povoamentos mistos, deste modo validando a utilização das frequências com base no conjunto de 60 observações. O programa GENEPOP confirmou esta conclusão (diferenciação génica,  $P = 0,65$ ; diferenciação genotípica,  $P = 0,77$ ).

Tabela 4.20 — Frequências dos alelos no *locus Pgm* de azinheira, a partir da amostragem de adultos nos povoamentos mistos e de plantas jovens nos povoamentos de referência, com arredondamento à 4ª casa decimal. N, número de zimogramas observados.

	Banda	a'	a	b	c	d	
<i>Pgm</i>	Alelo	1	2	3	4	5	N
mistos	Mitra	0	0,1	0,16	0,74	0	25
	Feijoas	0,025	0,175	0,2	0,575	0,025	20
	Alfaiates	0	0,1667	0,2	0,6333	0	15
	Conjunto	0,0083	0,1417	0,1833	0,6583	0,0083	60
referência	Azeiteiros	0	0,1293	0,3146	0,5463	0,0098	205
	Testa	0,0073	0,0985	0,2007	0,6679	0,0255	137

Na tabela 4.21 resumem-se os parâmetros de Gregorius para este *locus*. Os valores parecem bastante homogêneos entre povoamentos, embora sejam patentes valores mais baixos de  $v$  e  $\delta_T$  na Mitra, e um  $D_j$  mais elevado na Mitra e em Azeiteiros.

Tabela 4.21 — Estatísticas populacionais de Gregorius (diversidade genética ou número efectivo de alelos  $v$ , diferenciação total no povoamento  $\delta_T$ , diferenciação de cada povoamento em relação aos restantes  $D_i$ ) no locus *Pgm* de azinheira, a partir dos valores das frequências na tabela 4.20.

Parâmetro	Mitra	Feijoas	Alfaiates	Conjunto	Azeiteiros	Testa
$v$	1,715	2,484	2,133	2,052	2,414	2,013
$\delta_T$	0,434	0,629	0,569	0,521	0,589	0,507
$D_i$	0,134	0,091	0,042		0,124	0,062
$D_i$				0,084	0,132	0,085

As distribuições genótípicas nos povoamentos mistos não se afastam significativamente das esperadas no modelo de Hardy-Weinberg, conforme documenta a tabela 4.22.

Tabela 4.22 — a) Distribuição dos fenótipos PGM de azinheira nos povoamentos mistos, separadamente e em conjunto, e teste  $\chi^2$  (1 g.l., com correcção de Yates) para os valores esperados (distribuição de Hardy-Weinberg) do fenótipo c, heterozigóticos ( $\_c$ ) com a banda c, e restantes (etc), representados com 4 algarismos significativos. b) Teste  $\chi^2$  (1 g.l.) para os valores esperados (distribuição de Hardy-Weinberg) de 5 classes fenotípicas no conjunto dos povoamentos. Sublinham-se, em ambos os testes, os valores esperados abaixo de 5.

a)	PGM								valores esperados					
	a	ab	ac	a'c	b	bc	bd	c	total	c	$\_c$	etc	$\chi^2$	P
Mitra		1	4		1	5		14	25	13,69	9,620	<u>1,690</u>	0,03	0,87
Feijoas	2	1	2	1	1	4	1	8	20	6,612	9,775	<u>3,612</u>	0,87	0,35
Alfaiates	1		3		2	2		7	15	6,017	6,967	<u>2,017</u>	0,46	0,50
Conjunto	3	2	9	1	4	11	1	29	60	26,00	26,99	7,004	2,25	0,13

b)	valores esperados							
	ac	ab+b	bc	c	etc	$\chi^2$	P	
Conjunto	11,19	5,133	14,48	26,00	<u>3,188</u>	2,79	0,09	

Os valores do coeficiente de fixação foram de 0,04 em Mitra, 0,25 em Feijoas e 0,37 em Alfaiates, mas trata-se de valores talvez pouco representativos pela reduzida dimensão das amostragens respectivas (aliás, o valor do  $F_{ST}$  resultante foi negativo), enquanto no conjunto se obteve 0,22.

Nos povoamentos de referência, só se observaram desvios significativos em relação à expectativa do modelo de Hardy-Weinberg em Azeiteiros, principalmente pelo déficit de indivíduos ab (tabela 4.23). Este desvio pode ser fortuito, por isso, apesar do erro de tipo I ser pequeno (0,035),

pode não ser correcto rejeitar a hipótese de conformidade com o modelo (aliás, o valor de  $P = 0,25$  obtido com o programa GENEPOP parece confirmar esta interpretação).

### Locus *Pgi-B* (sobreiros)

Em conformidade com a nomenclatura adoptada por outros autores [Jiménez *et al.* 1999], o *locus* para as actividades polimórficas foi designado *Pgi-B*. Na tabela 4.24 apresentam-se as frequências dos 3 alelos identificados no presente estudo nos sobreiros da população de referência (plantas jovens) e montados mistos (adultos).

Tabela 4.23 — Distribuição dos fenótipos PGM de azinheira nos povoamentos de referência (plantas jovens), e teste  $\chi^2$  (1 g.l.) para os valores esperados (distribuição de Hardy-Weinberg), representados com 4 algarismos significativos (d\_ representa todos as classes fenotípicas com banda d, e a'\_ as com a banda a', excepto a'd).

	PGM										total	F	
	a'c	a'd	a	ab	ac	ad	b	bc	bd	c			cd
Azeiteiros			6	10	31		24	70	1	60	3	205	0,04
Testa	1	1	2	7	15	1	6	34	2	65	3	137	0,07
valores esperados													
	ab	ac	b	bc	c	d_+a+a'_	$\chi^2$	P					
Azeiteiros	16,68	28,96	20,29	70,48	61,19	7,406	4,43	0,04					
Testa	5,420	18,03	5,520	36,73	61,11	10,18	1,53	0,22					

Tabela 4.24 — Frequências dos alelos no *locus Pgi-B* de azinheira, a partir da amostragem de adultos nos povoamentos mistos e de plantas jovens nos povoamentos de referência, com arredondamento à 4ª casa decimal. N, número de zimogramas observados.

	Banda	a	b	c	
<i>Pgi-B</i>	Alelo	1	2	3	N
mistos	Mitra	0,5875	0,3875	0,025	40
	Feijoas	0,7419	0,2581	0	31
	Alfaiates	0,725	0,275	0	20
	Conjunto	0,6703	0,3187	0,011	91
referência	M <sup>e</sup> . Branco	0,5763	0,4237	0	177

A forte semelhança entre as frequências dos alelos predominantes (*Pgi-B*<sup>1</sup> e *Pgi-B*<sup>2</sup>) e as obtidas de populações da Península Ibérica noutros estudos [Toumi & Lumaret 1998, Jiménez 2001], a que acresce a identidade das taxas de migração implícitas na designação dos alelos por Toumi & Lumaret [1998] (*Pgi1*<sup>.90</sup> o mais frequente, *Pgi1*<sup>.70</sup> o segundo, e

*Pgi1*<sup>.50</sup> ou terceiro, correspondendo às migrações tipificadas pelas posições a, b e c no presente estudo, tabela 4.8) sugerem tratar-se do mesmo *locus*.

A análise das distâncias genéticas de Nei, neste *locus*, sugere uma maior identidade entre os sobreiros da Mitra e os de Monte Branco ( $D = 0,0019$ ), e entre os de Feijoas e Alfaiates (esta com um valor extremamente baixo  $D = 0,0004$ ). Mesmo assim, o valor de  $G_{ST}$  entre os 3 povoamentos mistos situou-se em 1,88%, sugerindo uma baixa diferenciação populacional, corroborada pelo teste através duma tabela de contingência, que deu  $\chi^2 = 4,46$  (2 g.l. juntando os alelos 2 e 3 numa só classe,  $P = 0,11$ ), donde se conclui que as frequências neste *locus* são homogêneas entre os 3 povoamentos mistos, deste modo validando a utilização das frequências com base no conjunto de 91 observações. O programa GENEPOP confirmou esta conclusão (diferenciação génica,  $P = 0,19$ ; diferenciação genotípica,  $P = 0,13$ ), mas não a presumida proximidade entre Mitra e Monte Branco.

Na tabela 4.25 resumem-se os parâmetros de Gregorius para este *locus*. Os valores parecem bastante homogêneos entre povoamentos, embora seja patente um valor mais elevado de  $D_j$  em Feijoas e em Monte Branco.

Tabela 4.25 — Estatísticas populacionais de Gregorius no *locus Pgi-B* de sobreiro, a partir dos valores das frequências na tabela 4.24.

Parâmetro	Mitra	Feijoas	Alfaiates	Conjunto	M <sup>e</sup> . Branco
v	2,016	1,621	1,663	1,815	1,955
$\delta_T$	0,517	0,396	0,420	0,454	0,491
$D_j$	0,094	0,112	0,090		0,117

Tabela 4.26 — Distribuição dos fenótipos PGI de sobreiro nos povoamentos mistos, separadamente e em conjunto, e teste  $\chi^2$  (1 g.l., com correcção de Yates) para os valores esperados (distribuição de Hardy-Weinberg) do fenótipo a, heterozigóticos (a) com a banda a, e restantes (etc), representados com 4 algarismos significativos. Sublinham-se os valores esperados abaixo de 5.

	PGI				total	valores esperados			$\chi^2$	P
	a	ab	b	bc		a	ab	b+bc		
Mitra	16	15	7	2	40	13,81	19,39	6,806	1,46	0,23
Feijoas	16	14	1		31	17,06	11,87	<u>2,065</u>	0,52	0,47
Alfaiates	9	11			20	10,51	7,975	<u>1,513</u>	1,86	0,17
Conjunto	41	40	8	2	91	40,89	40,22	9,890	0,02	0,88

As distribuições genotípicas nos povoamentos mistos não se afastam significativamente das esperadas no modelo de Hardy-Weinberg, conforme documenta a tabela 4.26.

Os valores do coeficiente de fixação foram de 0,16 em Mitra, -0,18 em Feijoas e -0,38 em Alfaiates, mas trata-se de valores talvez pouco representativos pela reduzida dimensão das amostragens respectivas (o GENEPOP dá estimativas muito semelhantes, com valores de P não significativos); no conjunto obteve-se uma estimativa de -0,03, com um  $F_{ST}$  de 4,5% (1,7% usando a definição de Weir & Cockerham [1984], calculada por GENEPOP).

No povoamento de referência, porém, observaram-se desvios significativos em relação à expectativa do modelo de Hardy-Weinberg (tabela 4.27), relacionadas com um excedente de homozigóticos traduzido num valor  $F = 0,33$ .

Tabela 4.27 — Distribuição dos fenótipos PGI de sobreiro no povoamento de referência de Monte Branco (plantas jovens), e teste  $\chi^2$  (1 g.l.) para os valores esperados (distribuição de Hardy-Weinberg), representados com 4 algarismos significativos.

	PGI			total	valores esperados			$\chi^2$	P
	a	ab	b		a	ab	b		
Monte Branco	7	5	4	177	58,7	86,4	31,7	19,1	< 0,001
	3	8	6		8	4	8	6	

## 2) Análise familiar

O conhecimento, para os povoamentos mistos, dos genótipos das plantas e das suas progenitoras, permitiu estimar as frequências alélicas na fase haplóide (dos gâmetas femininos e masculinos que deram origem a essas plantas), compará-los com os das plantas, e calcular o coeficiente de fixação. Depois de excluídos os contaminantes (cf. tabela 4.10 para o locus *Pgm*), em cada família procedeu-se à comparação entre os zimogramas da árvore e das descendentes, em geral permitindo identificar o alelo transmitido pelo pólen — por exemplo, 5 descendentes da árvore 27 de Alfaiates (cujo zimograma de PGI é a) apresentaram zimograma PGI a, e 1 o zimograma ab, donde se deduz que houve 5 grãos de pólen portadores do alelo *Pgi-B*<sup>1</sup>, e 1 do alelo *Pgi-B*<sup>2</sup>. Noutra exemplo, à árvore 60 da Mitra, com zimograma PGM bc, corresponderam 45 plantas distribuídas por 6 classes de zimogramas diferentes (2 com zimograma ab, 2 b, 1 a'c, 7 ac, 24 c, e 9 bc); considerando os 5 alelos do locus *Pgm*, contar-se-iam para as primeiras 5 classes outros tantos grãos de pólen portadores dos alelos *Pgm*<sup>2</sup>, *Pgm*<sup>3</sup>, *Pgm*<sup>1</sup>, *Pgm*<sup>2</sup>, *Pgm*<sup>4</sup>, respectivamente, mas para a classe bc poderiam ser portadores de *Pgm*<sup>3</sup> ou *Pgm*<sup>4</sup> —



embora estes 9 casos formalmente fossem indeterminados, teoricamente 4,5 seriam portadores de *Pgm*<sup>3</sup> e os outros 4,5 de *Pgm*<sup>4</sup>. As tabelas 4.28 e 4.29 resumem a informação obtida para os dois *loci*.

A partir destes dados pode fazer-se o cálculo das frequências alélicas em cada *locus*, tanto para os dois tipos de gâmetas na fase haplóide como para as plantas (tabelas 4.30 e 4.31) [Bacilieri *et al.* 1996]. Nos gráficos da figura 4.17 faz-se a correspondente ilustração. É patente a variação nas frequências entre os três povoamentos, o que deverá reflectir um efeito da amostragem, e a par disso uma discrepância quase generalizada entre gâmetas femininos e masculinos, no que respeita às respectivas frequências. Onde o desvio entre as frequências nos gâmetas são mais pronunciados (principalmente no caso do *locus Pgm*), as frequências nas plantas situam-se em geral num valor intermédio entre as dos gâmetas (excepção apenas para o alelo 3 na Mitra).

Fazendo o cálculo de  $F = 1 - H_o/H_e$  para as plantas (tabela 4.32), resulta para o conjunto dos povoamentos mistos um valor de  $-0,049$  para o *locus Pgm* de azinheira e de  $0,074$  para o *locus Pgi-B* de sobreiro. No entanto, estes valores só têm significado assumindo que as frequências são homogêneas entre gâmetas masculinos e femininos. Não o sendo, como sugerem as tabelas 4.30 e 4.31 (e figura 4.17), os valores de  $H_e$  serão diferentes (modelo II na tabela 4.32), de que resulta  $F = 0,028$  e  $0,080$ , respectivamente. Mais ainda, os valores de referência para estes  $F$  nas plantas, reflectindo a discrepância (correlação negativa) entre os gâmetas, é negativo, o que pode significar uma estimativa de  $N_e$  bastante baixa, na ordem dos  $4,66$  para azinheira e  $5,87$  para sobreiro.

Em referência ao modelo de Wright de subdivisão populacional, os valores de  $F_{obs}$  na tabela 4.32 são o  $F_{IT}$ , e a partir do  $H_e$  médio (entre povoamentos) obtêm-se no modelo I  $F_{IS} = -0,138$  para *Pgm* (azinheira) e  $0,102$  para *Pgi-B* (sobreiro); mas se no primeiro caso o  $F_{ST}$  resultante é  $0,078$ , no segundo é negativo. Usando os  $H_e$  do modelo II, tem-se  $F_{IS} = -0,046$  ( $F_{ST} = 0,070$ ) para *Pgm* e  $F_{IS} = 0,108$  ( $F_{ST}$  negativo) para *Pgi-B*. Dado tratar-se apenas de 3 subpopulações, é de admitir que os dados sejam pouco adequados para este tipo de análise. Com estes valores de  $F_{ST}$  para *Pgm* deduz-se  $N_e m = 1,32$  ou  $1,47$  (modelo I ou modelo II, respectivamente). Da estimativa de  $N_e$  dada acima para o modelo II ( $4,66$ ) obtêm-se  $m = 0,315$ .

Tabela 4.28 — Frequências para os zimogramas PGM nas plantas e frequências para os alelos do *locus Pgm* de azinheira nos gâmetas que lhes deram origem, referentes aos povoamentos mistos.

	gâmetas femininos				zimogramas PGM								gâmetas masculinos					
	plantas	<i>Pgm</i> <sup>2</sup>	<i>Pgm</i> <sup>3</sup>	<i>Pgm</i> <sup>4</sup>	a'a	a	ab	b	a'c	ac	bc	c	cd	<i>Pgm</i> <sup>1</sup>	<i>Pgm</i> <sup>2</sup>	<i>Pgm</i> <sup>3</sup>	<i>Pgm</i> <sup>4</sup>	<i>Pgm</i> <sup>5</sup>
Mitra	137	16	27,5	93,5		4	4	3	3	39	25	59		3	41,5	23	69,5	
Feijoas	49	0	3	46				1		7	8	33		7	8	34		
Alfaiates	118	14,5	1	102,5	1	2	2		3	22	24	61	3	4	16,5	26	68,5	3
Conjunto	304	30,5	31,5	242	1	6	6	4	6	68	57	153	3	7	65	57	172	3

Tabela 4.29 — Frequências para os zimogramas PGI (polimórfica) nas plantas, e frequências para os alelos do *locus Pgi-B* de sobreiro nos gâmetas que lhes deram origem, referentes aos povoamentos mistos.

	gâmetas femininos			zimogramas PGI				gâmetas masculinos		
	plantas	<i>Pgi-B</i> <sup>1</sup>	<i>Pgi-B</i> <sup>2</sup>	a	ab	b	ac, bc	<i>Pgi-B</i> <sup>1</sup>	<i>Pgi-B</i> <sup>2</sup>	<i>Pgi-B</i> <sup>3</sup>
Mitra	110	51,5	58,5	37	53	19	1	66,5	42,5	1
Feijoas	167	105	62	75	68	23	1	104	62	1
Alfaiates	333	244	89	190	118	24	1	229	103	1
Conjunto	610	400,5	209,5	302	239	66	3	399,5	207,5	3

Tabela 4.30 — Frequências dos alelos no *locus Pgm* de azinheira, considerando os gâmetas femininos, gâmetas masculinos e plantas.

alelo	2				3				4				1 e 5			
	Mitra	Feij.	Alf.	todos	Mitra	Feij.	Alf.	todos	Mitra	Feij.	Alf.	todos	Mitra	Feij.	Alf.	todos
pov.																
Femin.	0,117	0,000	0,123	0,100	0,201	0,061	0,008	0,104	0,682	0,939	0,869	0,796	0,000	0,000	0,000	0,000
Masc.	0,303	0,143	0,140	0,214	0,168	0,163	0,220	0,188	0,507	0,694	0,581	0,566	0,022	0,000	0,059	0,033
Plant.	0,186	0,071	0,123	0,143	0,128	0,102	0,110	0,117	0,675	0,827	0,737	0,724	0,011	0,000	0,030	0,016

Tabela 4.31 — Frequências dos alelos no *locus Pgi-B* de sobreiro, considerando os gâmetas femininos, gâmetas masculinos e plantas.

alelo	1				2				3			
	Mitra	Feij.	Alf.	todos	Mitra	Feij.	Alf.	todos	Mitra	Feij.	Alf.	todos
pov.												
Femin.	0,468	0,629	0,733	0,657	0,532	0,371	0,267	0,343	0,000	0,000	0,000	0,000
Masc.	0,605	0,623	0,688	0,655	0,386	0,371	0,309	0,340	0,009	0,006	0,003	0,005
Plant.	0,577	0,653	0,749	0,691	0,418	0,344	0,249	0,307	0,005	0,003	0,002	0,002

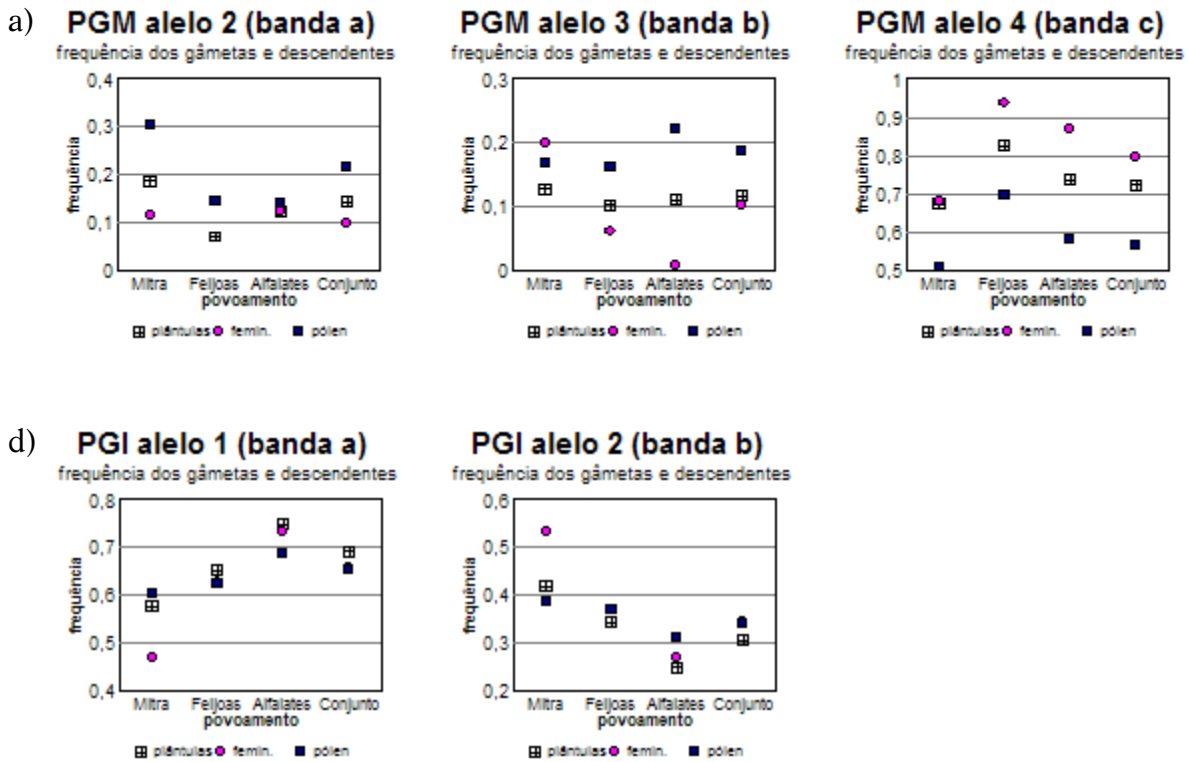


Figura 4.17 — Frequências dos alelos comuns no *locus Pgm* de azinheira (gráficos a, b, c) e no *locus Pgi-B* de sobreiro (gráficos d, e), estimadas para os dois tipos de gâmetas e para as plantas nos povoamentos mistos.

Tabela 4.32 — Valores observados ( $H_o$ ) e esperados ( $H_e$ ) de frequência de heterozigóticos, calculados levando em conta as frequências alélicas nas plantas (modelo I) ou levando em conta os desvios  $\Delta x_i$  entre essas frequências e as estimadas para o pólen (tabelas 4.30 e 4.31, modelo II). O coeficiente de fixação  $F_{obs} = 1 - H_o/H_e$  resultante tem por referência o valor 0 no modelo I e o valor  $F_{esp}$  no modelo II; por isso, no modelo II calcula-se o  $N_e$  em função da diferença  $F_{obs} - F_{esp}$  ( $\Delta F$ ).

Locus	<i>Pgm</i> (azinheira)					<i>Pgi-B</i> (sobreiro)				
	Mitra	Feij.	Alf.	média	todos	Mitra	Feij.	Alf.	média	todos
$H_o$	0, 518	0, 306	0, 466		0,464	0,491	0,413	0, 357		0, 397
I $H_e$	0, 493	0, 301	0, 429	0,408	0,442	0,492	0,455	0, 378	0,442	0, 429
$F_{obs}$	-0,051	-0,016	-0,087		-0,049	0,002	0,093	0, 055		0, 074
$N_e$						276,78	5,39	9,16		6,73
II $H_e$	0, 537	0, 328	0, 466	0,444	0,477	0,494	0,457	0, 389	0,445	0, 431
$F_{obs}$	0, 034	0, 066	0, 000		0,028	0,006	0,096	0, 069		0, 080
$F_{esp}$	-0,088	-0,088	-0,087		-0,079	-0,004	-0,004	-0,020		-0,006
$\Delta F$	0, 123	0, 154	0, 088		0,107	0,009	0,100	0, 089		0, 085
$N_e$	4,08	3,25	5,71		4,66	54,72	5,02	5,63		5,87

Pode estimar-se a percentagem de pólen não-aparentado geneticamente, definida como  $t = (1 - F)/(1 + F)$  [Brown & Allard 1970], mas substituindo F pelo valor  $\Delta F$ , visto que o valor de referência para F não é 0. Assim,  $t_{Pgm} = 81\%$  e  $t_{Pgi-B} = 84\%$ .

Todos os resultados em *Pgm* de azinheira se mantêm, no essencial, caso se considere que a árvore A21 tinha genótipo ac, deste modo integrando-se um total de 27 plantas (cf. tabela 4.10 e texto respectivo); por exemplo, a estimativa de  $N_e$  é 4,51, a de  $m$  0,346, e a de  $t_{Pgm}$  80%.

## F — Sinopse

Das análises de rotina, visando primariamente a validação dos marcadores discriminantes e a detecção de híbridos, foi possível:

1. A confirmação dos contaminantes interspecíficos e a detecção de parte dos intra-específicos.
2. A caracterização parcial de 9 híbridos, sendo que SM2 pode já ser descendente de híbrido por retrocruzamento com sobreiro.
3. Na ausência de híbridos nas descendências dos povoamentos mistos em 1998, o cálculo de majorantes da probabilidade de hibridação, para esses povoamentos e nesse ano, sendo a estimativa mais conservadora de  $P < 0,043\%$ .
4. A caracterização de adultos e plantas jovens com fenótipos atípicos, sendo que o número de casos de introgressão parece ser muito reduzido.
5. A caracterização de 45 amostras de sobreiros de cortiça preguenta, tendo-se detectado em 2 marcadores (DIA e PER) sinais de possível introgressão de genes de azinheira nalgumas árvores.
6. Uma quantificação dos valores de especificidade e sensibilidade, na distinção de híbridos e azinheiras em relação a sobreiro, dos marcadores utilizados nas análises de rotina.
7. A determinação da origem do pólen nas descendências dos híbridos SM1, SM2 e SES.
8. A análise das frequências intra-específicas nos *loci Pgm* (azinheiras) e *Pgi-B* (sobreiros), com relevo para considerarem-se os três povoamentos mistos, como fazendo parte duma mesma população, em ambas espécies, e a determinação de vários estimadores populacionais.
9. A análise familiar para os mesmos *loci* revelou diferenças entre as distribuições de frequências no pólen, gâmetas femininos e plantas, especialmente em *Pgm*, e permitiu determinar valores neutrais de  $N_e$  na ordem de 5 a 7 em ambas as espécies.

10. A estimativa para a percentagem de pólen não-aparentado é de 81% para azinheira (*Pgm*) e 84% para sobreiro (*Pgi-B*).

## Parte IV: Outros registos

### A — Sobreiros do projecto FAIR 01 CT 0202/95

A análise de 42 plantas representando 22 das proveniências reunidas nesse projecto manteve-se dentro dos critérios já existentes para os marcadores ensaiados, designadamente: todos DIA “Sb”, todos MDH “Sb(Sb)”, polimorfismos PGI “a”, “ab”, “ac”, “b”, “c” e todas com a banda EST 2 (e duas com bandas suplementares 3 e 3\*).

No que respeita à PGI, as frequências dos alelos do *locus* polimórfico distribuíram-se da seguinte maneira: alelo 1 (banda a) 0,5833; alelo 2 (banda b), 0,3810; alelo 3 (banda c), 0,0357. No geral, esta distribuição parece concordar com os resultados da tabela 4.24.

### B — Outros táxones

Na figura 4.18 apresentam-se alguns resultados com uma série de espécies da ordem Fagales (esquematizada em 4.18 a). As actividades mais consistentes em sobreiro e azinheira foram-no também no conjunto de espécies analisadas, algumas com extractos de quase 1 ano, podendo evidenciar-se variações interspecíficas e, nalguns casos, intra-específicas.

As actividades PGI (figura 4.18 b) distribuíram-se em cada amostra por dois grupos, sendo que a migração da mais rápida era muito homogénea e aparentemente monomórfica entre todas as amostras, enquanto as mais lentas davam frequentemente um tripleto de bandas, atribuído a genótipos heterozigóticos. Notaram-se diferenças intra-específicas nos *Juglans*, nos *Quercus ilex* (e talvez *Q. pyrenaica*), nos *Betula* e nos *Corynecarpus*. O exemplar de sobreiro tem apenas a banda b ( $R_f = 0,39$ ) nesta componente polimórfica, o que neste gel o distingue de todas as Fagales à excepção de *Q. rubra*.

Das actividades EST separadas no sistema R (figura 4.18 c), as que migram rapidamente para o ânodo ocorrem em quase todos os *Quercus* (excepto *Q. rubra*), assim como nos *Castanea*, nos *Betula* e num dos *Corynecarpus*, enquanto numa das amostras de *Fagus* aparece apenas a actividade  $\beta$ -esterásica (precipitado de cor rosa); as que quase não migram (reveladas junto à origem da electroforese) apareceram em geral

nessas mesmas amostras e ainda nos *Casuarina*.

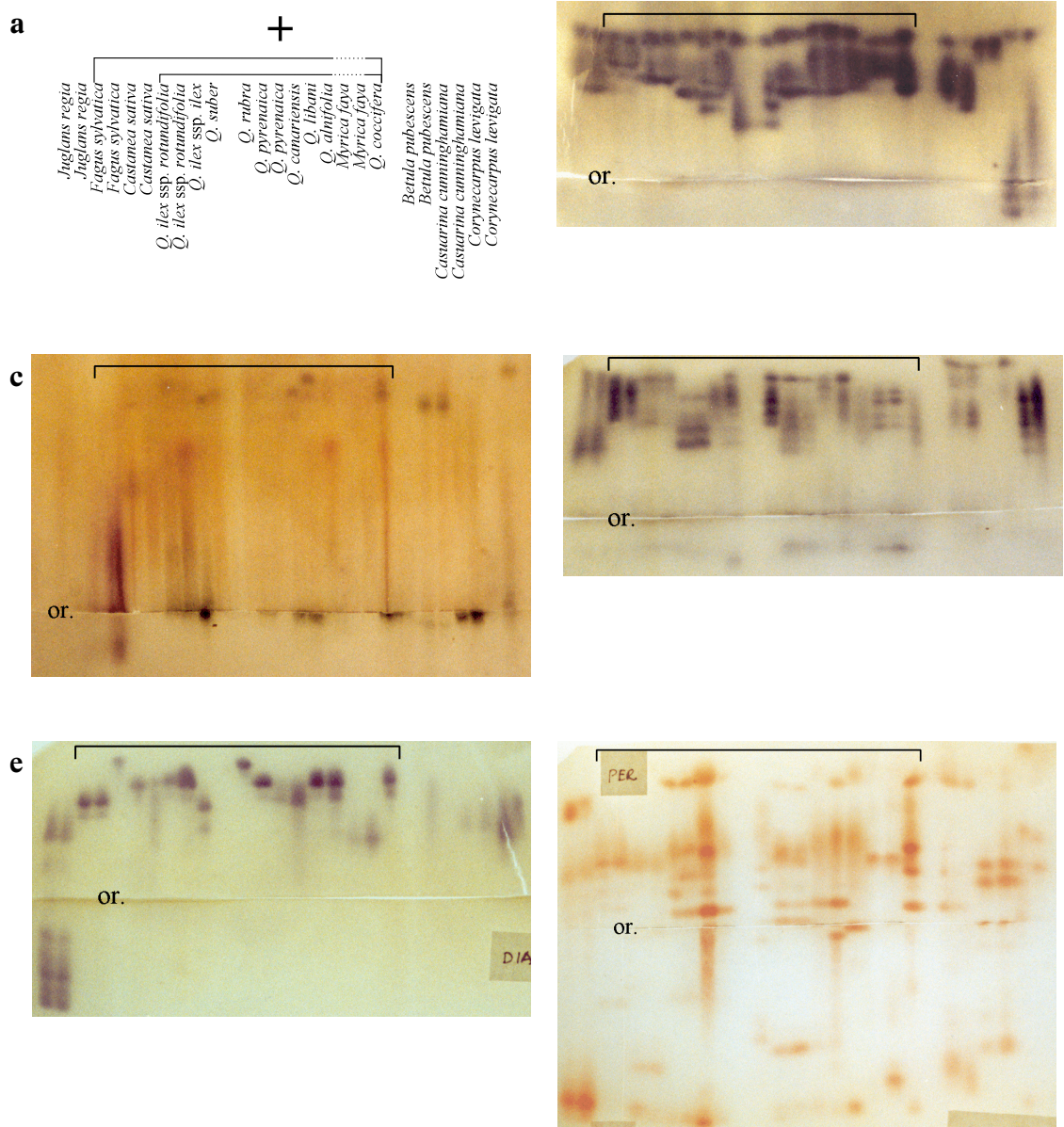


Figura 4.18 — Demonstração dalgumas actividades enzimáticas em espécies da ordem Fagales (com duas amostras de *Corynecarpus laevigata* como espécie de referência). a) Esquema geral da disposição das amostras no gel. As duas amostras de *Quercus ilex* ssp. *rotundifolia* são 2 adultos de Alfiates (extractos 42a e 42g), as restantes foram obtidas expressamente para esta análise. A chaveta interna abrange as amostras do género *Quercus*, a chaveta externa as fagáceas (ambas exceptuando as de *Myrica faya*). b) PGI (sistema R). c) EST (sistema R). d) MDH (sistema C). e) DIA (sistema C). f) PER (sistema C). Em todas as fotos assinala-se a posição de origem da electroforese (“or.”) e a chaveta externa entre *Fagus sylvatica* e *Quercus coccifera*.

As actividades MDH (figura 4.18 d) no lado catódico apareceram apenas nas fagáceas, sendo a de *Q. suber* a mais rápida, enquanto no lado anódico há notáveis variações entre os diversos *Quercus*, merecendo especial destaque a diferença entre as duas subespécies de *Q. ilex*. De resto, neste gel as espécies representadas por 2 indivíduos mostraram

zimogramas idênticos nos dois exemplares analisados.

As actividades DIA (figura 4.18 e) revelam-se marcadamente variáveis dentro do género *Quercus*, e há exemplos de variação intra-específica (nos *Castanea* e em *Q. pyrenaica*; um dos *Q. ilex* ssp. *rotundifolia* é a azinheira 11 de Alfaiates, cujo zimograma é aparentemente híbrido com sobreiro, cf. parte III, secção C1). Só as actividades dos *Myrica* são tão lentas como as de *Q. suber*. De notar a presença de bandas dos *Juglans* no lado catódico.

As actividades PER (figura 4.18 f) revelam bastante complexidade em quase todas as espécies, sendo aparente a existência de marcadores do lado anódico distintivos entre espécies do género *Quercus*, que talvez valha a pena levar em consideração em futuros trabalhos sobre hibridismo. De notar o invulgar zimograma de *Q. rubra* face a outros *Quercus*, e a ausência da banda 1 em *Fagus* e *Castanea*.

Finalmente, a revelação de LAP (sistema R) deu uma única banda invariável entre fagáceas (e também *Juglans*), mas com migração diferente nos *Myrica*, *Betula* e *Coryneparpus*.

## C — Sinopse

1. A análise de sobreiros de proveniências de 7 países não revelou qualquer padrão isoenzimáticos que viesse pôr em causa a especificidade dos marcadores de hibridismo definidos com base nos povoamentos de referência (Santiago do Cacém, Azeiteiros e Testa) e mistos (Mitra, Feijoas do Ramos e Alfaiates).

2. A aplicação do mesmo protocolo de extracção a outras Fagales mostrou a variação mais ou menos acentuada dos padrões isoenzimáticos entre níveis taxonómicos (variavelmente segundo as actividades em causa), e confirmou o potencial de aplicação destes marcadores à discriminação entre outros táxones.