



Universidade de Évora

Prova de doutoramento de Paulo Guilherme Leandro de Oliveira

A análise isoenzimática na identificação de híbridos de sobreiro com azinheira

Orientadora:

Professora Doutora Maria Helena Almeida

Co-orientadora:

Professora Doutora Annemarie Carola Meierrose Araújo

Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri

Évora, 2006

Resumo

Face às dúvidas que persistem sobre a origem híbrida dos sobreiros de cortiça “preguenta”, a qual é argumento incontornável na discussão recorrente sobre os povoamentos mistos de sobreiro e azinheira em Portugal, e para obter estimativas credíveis da taxa de hibridação nestes povoamentos, estabeleceram-se critérios genéticos de discriminação entre as duas espécies e os híbridos. O presente trabalho documenta os seguintes progressos nessa investigação:

- I. Descoberta e validação de marcadores isoenzimáticos para a distinção entre sobreiro e híbridos ou descendentes destes;
- II. Confirmação do estatuto híbrido de árvores conhecidas como carvalhos cerqueiros através de marcadores genéticos;
- III. Estimativa duma taxa de hibridação muito baixa (inferior a 0,1%), nas parcelas mistas estudadas;
- IV. Detecção em sobreiros como em azinheiras de marcadores de introgressão da outra espécie;
- V. Análise preliminar de sobreiros de cortiça preguenta;
- VI. Análise preliminar das descendências de híbridos, incluindo a demonstração de que intervêm grãos de pólen de qualquer uma das espécies parentais, assim como uma taxa relativamente elevada de aparentes autopolinizações;
- VII. Análise preliminar das frequências alélicas em dois *loci* marcadores, um de cada espécie, e dedução dum valor neutral de N_e relativamente baixo (entre 5 e 7);
- VIII. Demonstração da mesma metodologia noutras espécies do género *Quercus* e táxones aparentados.

Embora ainda sem carácter definitivo, os valores estimados da taxa de hibridação entre sobreiro e azinheira indicam tratar-se dum evento geralmente excepcional, podendo admitir-se que localmente seja mais frequente.

O método desenvolvido pode ser aplicado em larga escala para a detecção de híbridos em materiais de propagação de sobreiro, com custo relativamente baixo, e pode ainda contribuir para o esclarecimento de várias questões relacionadas com a biologia da reprodução das duas espécies e dos híbridos entre elas, na continuação do que o presente trabalho estudou preliminarmente.

Resumen

Dadas las dudas que persisten sobre el origen híbrido de los alcornoques de corcho "preguento", la cual es argumento incontornable en la discusión recurrente sobre los poblamientos mixtos de alcornoque y encina en Portugal, y para obtener estimativas creíbles de la tasa de hibridización en estos poblamientos, se establecieron criterios genéticos de discriminación entre las dos especies y los híbridos. El presente trabajo documenta los siguientes progresos en esa investigación:

- I. Descubierta y validación de marcadores isoenzimáticos para la distinción entre alcornoque e híbridos o descendientes de estos últimos;
- II. Confirmación del status híbrido de los árboles que son conocidos como robles "cerqueiros" a través de marcadores genéticos;
- III. Estimativa de una tasa de hibridación muy baja (inferior a 0,1%), en las parcelas mixtas estudiadas;
- IV. Detección en alcornoques como en encinas de marcadores de introgresión de la otra especie;
- V. Análisis preliminar de alcornoque de corcho preguento;
- VI. Análisis preliminar de los descendientes de híbridos, incluso la demostración de que intervienen granos de pólen de cualquier una de las especies parentales, así como una tasa relativamente elevada de aparentes autopolinizaciones;
- VII. Análisis preliminar de las frecuencias alélicas en dos *loci* marcadores, uno de cada especie, y deducción de un valor neutral de N_e relativamente bajo (entre 5 y 7);
- VIII. Demostración de la misma metodología en otras especies del género *Quercus* y taxones aparentados.

A pesar de quedaren sin carácter definitivo, los valores estimados de la tasa de hibridización entre alcornoque y encina indican tratarse de un evento generalmente excepcional, pudiendo admitirse que sea localmente más frecuente.

El método desarrollado puede aplicarse en larga escala para la detección de híbridos en materiales de propagación de alcornoque (o encina), con costo relativamente bajo, y puede también contribuir para el esclarecimiento de diversas cuestiones relacionadas con la biología de reproducción de las dos especies y de los híbridos entre ellas, en la línea de lo que el presente trabajo ha estudiado preliminarmente.

Summary

Regarding the continuing controversy on the hybrid origin of the cork oaks producing nail-type cork, which is an essential issue in the recurring discussion over the cork-holm oak mixed groves in Portugal, and to obtain credible estimates of the hybridization rates in these groves, genetic criteria for the discrimination between both species and the hybrids were established. The present work is an account of the following progress in this research:

- I. Discovery and validation of isoenzyme markers for distinguishing cork oak and hybrids or their descendants;
- II. Confirmation of the hybrid status of trees known as “cerqueiro” oaks, using genetic markers ;
- III. Estimation of the hybridization rate at a very low value (less than 0.1%) in the mixed groves studied;
- IV. Detection in cork as well as holm oak, of introgressed markers from the other species;
- V. Preliminary analysis of nail-type cork-producing oaks;
- VI. Preliminary analysis of the progenies from hybrids, including the demonstration that pollen grains of either parental species are involved, as well as a relatively high rate of apparent selfings;
- VII. Preliminary analysis of the allelic frequencies in two marker loci, one in each species, and computation of a relatively low neutral estimate of N_e (between 5 and 7);
- VIII. Illustration of the same methodology with samples from other species of *Quercus* and related taxa.

Although an authoritative value for the rate of hybridization between cork and holm oak is yet to be obtained, the current estimates indicate that generally it is a rather exceptional event, but a relatively high local occurrence is admissible.

The developed methodology can be applied on a large scale for the detection of hybrids in propagation materials for cork oak, with relatively low cost, and it can contribute for an elucidation of various questions on the reproduction biology of both species and the hybrids between them, in line with the preliminary studies included in the present work.

Índice geral

Introdução

Contexto (1); Problema científico (2); Abordagem adoptada (4)

Revisão bibliográfica

Parte I: Taxonomia do género *Quercus* (7); Parte II: Biologia da reprodução e genética dos *Quercus* (15);
Parte III: Híbridos de sobreiro com azinheira em Portugal e na Bacia Mediterrânica (42); Parte IV: Separação de isoenzimas por electroforese (66)

Materiais e métodos

Parte I: Amostragem (105); Parte II: Material vegetal utilizado (110); Parte III: Obtenção de extractos enzimáticos e sua conservação (117); Parte IV: electroforeses em gel de amido (124); Parte V: revelação de isoenzimas (131); Parte VI: registo e análise dos resultados (135)

Resultados

Parte I: Enzimas ensaiados (141); Parte II: Análises (146); Parte III: Aplicações (171); Parte IV: Outros registos (194)

Discussão e conclusões

Parte I: os carvalhos cerqueiros são híbridos (197); Parte II: Baixa probabilidade de formação de híbridos (201); Parte III: A biologia da reprodução e o hibridismo (220); Parte IV: Metodologia (225); Conclusões (233)

Glossário e apêndices

Glossário (235); Apêndice I: mapas e fotos (238); Apêndice II: estudos diversos (253); Apêndice III: protocolos, tinas de electroforese e formulário (267); Apêndice IV: resumo das famílias analisadas e exemplos de SQL (279)

Agradecimentos (283)

Bibliografia (284)