

Introdução

A — Contexto

O hibridismo entre sobreiro e azinheira, descrito em Portugal desde há várias gerações [Coutinho 1888], pode estar na origem duma classe de sobreiros cuja cortiça, dita “preguenta”, se inclui entre as de pior qualidade [Natividade 1934, 1936, 1950]. Segundo essa hipótese, a presença nos povoamentos de sobreiro destes híbridos, dos sobreiros “preguentos” (que se supõem seus descendentes) e até das azinheiras, traz consigo o problema de perpetuar a produção destas cortiças e, deste modo, um prejuízo para a rentabilidade do sector.

Embora sustentada em argumentos científicos convincentes [Natividade 1936], a formulação desta hipótese nunca trouxe consequências para a gestão dos povoamentos mistos de sobreiro e azinheira, até porque os produtores não reconheceram menor qualidade na cortiça desses povoamentos (talvez até pelo contrário), em comparação com a daqueles onde não se encontram azinheiras. Só nos anos 80 se viu um renovado interesse na proposta ligação entre a cortiça “preguenta” e o hibridismo do sobreiro com a azinheira, a que não seria estranho o inconveniente económico que representavam as grandes extensões de azinheira ainda existentes, espécie que à época se encontrava cada vez mais desvalorizada mas tinha ficado protegida pela legislação, justificada inicialmente por pressões de outra ordem (Decreto-Lei n.º 327/90, de 22 de Outubro).

Pelo menos provisoriamente, não parece haver nenhuma ameaça de eliminação da azinheira das áreas produtoras de cortiça (e limítrofes), não só pelas limitações legais mas pelo reavivar do interesse económico dos povoamentos de azinho, seja através do incremento da exploração do porco de montanha, seja pela produção de certos fungos comestíveis que não se encontram noutras áreas, além doutros factores (lenha, protecção do solo, etc.). Assim, o esclarecimento da questão levantada à volta da origem genética da cortiça “preguenta” pode realizar-se num contexto de estabilidade no ordenamento dos montados de sobreiro e azinho, e uma vez conseguidos resultados que complementem os de Vieira Natividade pode encarar-se com mais realismo o verdadeiro impacto do hibridismo sobre a qualidade da produção corticeira. Mas esta questão ainda é complexa, por ainda hoje se desconhecerem as causas

genéticas da variação da qualidade da cortiça; e através duma análise genética sobre o hibridismo entre sobreiro e azinheira pode esperar-se até vir alguma luz, se bem que indirecta, sobre aspectos mais gerais dessa variação.

Esse esclarecimento também pode vir a ter algum impacto sobre o aproveitamento das landes para propagação. Actualmente, considera-se “boa prática” não recolher sementes dos povoamentos mistos com azinheira onde o sobreiro represente uma percentagem inferior a 75% [Machado *et al.* 2003], o que pode representar um desperdício, especialmente tendo em conta a elevada qualidade da cortiça de muitos destes povoamentos [Varela 1995]. Aliás, os materiais de propagação provenientes de povoamentos de sobreiro excluem grande parte dos que são mistos, com a exigência legal (decreto-lei 205/2003, anexo IX, parte A) de quando muito 15% doutras quercíneas; resta ver até que ponto isso é compatível com outra exigência, de que pelo menos 15% da cortiça dos povoamentos de origem seja de 1^a a 3^a qualidade (e menos de 30% de 6^a ou refugo) sem implicar uma excessiva limitação dos recursos genéticos utilizáveis, especialmente por poder limitar o potencial adaptativo do sobreiro.

B — Problema científico

As características da cortiça dos sobreiros resultam de três ordens de factores: em primeiro lugar, a especificidade genética desta espécie em relação aos outros *Quercus*, que se traduz na diferença entre formar-se ou não tecido suberoso, e que nos híbridos com azinheira se expressa macroscopicamente por uma cobertura suberosa atípica, tardia e menos desenvolvida, enquanto microscopicamente se revela como uma intercalação de padrões das duas espécies [Natividade 1936]; em segundo, o valor genotípico de cada sobreiro, principal objecto de interesse nos estudos que visam o melhoramento clássico da produção de cortiça; e finalmente, o condicionamento da acção dos factores genéticos pelas influências ambientais.

A abordagem genética ao hibridismo entre sobreiro e azinheira refere-se por isso à primeira ordem de factores enunciada — idealmente o objecto directo desse estudo, se fossem conhecidos, mas como não são recorre-se a indicadores da presença de genes das duas espécies no mesmo indivíduo. Trata-se neste caso de identificar marcadores genéticos que, sem forçosamente terem qualquer envolvimento na formação e qualidade da cortiça, sejam herdados com aqueles que o têm. Uma vez

feita essa identificação, pode determinar-se:

- o grau de introgressão de genes de azinheira nos sobreiros de cortiça “preguenta”;
- as características da cortiça em descendências de híbridos, retrocruzadas com pólen de sobreiro;
- a incidência de hibridismo nos povoamentos mistos de sobreiro e azinho.

A primeira determinação vem directamente na sequência da hipótese de Vieira Natividade, e permitiria identificar as causas da cortiça “preguenta” com uma ou mais das três ordens de factores de qualidade da cortiça. Mas os marcadores genéticos em questão só serão eficazes se os *loci* que os codificam estiverem ligados aos *loci* que serão a causa directa da cortiça ser “preguenta”; na hipótese destes sobreiros terem uma origem híbrida como proposto por Vieira Natividade, e mesmo que o número de gerações a separá-los desses híbridos seja reduzido, só se evitaria uma elevada taxa de erro nesta determinação dispondo dum elevado número de marcadores cobrindo todo o genoma dos híbridos, o que talvez seja possível com AFLPs [Vos *et al.* 1995, Cervera *et al.* 2000] mas ainda não foi tentado com estas espécies.

A segunda determinação passa por tentar reproduzir de maneira controlada o processo hereditário que ligaria os híbridos aos sobreiros “preguentos”, postulado por Vieira Natividade. A primeira geração descendente dos híbridos, para além duma minoria de autopolinizações (como é a regra para o género *Quercus*), seria predominantemente retrocruzada com sobreiro ou com azinheira, compondo-se provavelmente de representantes desses retrocruzamentos. Os marcadores genéticos permitem identificar os retrocruzamentos com sobreiro, desde que tenham uma sensibilidade suficiente para os teoricamente 25% de genes de azinheira presentes em cada indivíduo com essa origem, seguindo-se depois a busca de correlações entre diferentes tipos de cortiça e os mesmos (e outros) marcadores genéticos. Mantendo controladas as causas ambientais de variação, esta abordagem genética pode mesmo levar à localização cromossómica das duas primeiras ordens de factores enunciadas acima.

A terceira determinação é feita a partir da amostragem de descendentes das duas espécies, visando em primeiro lugar obter um valor para a probabilidade de se formarem descendentes híbridos nos povoamentos mistos, em azinheiras polinizadas por sobreiro e vice-versa. Os marcadores genéticos identificam cada um desses híbridos, e numa

abordagem comparativa permitem analisar factores de risco preferencial de hibridismo, sobretudo ambientais (sejam eles naturais, ou relacionados com o granjeio). Neste caso não se investigam as causas da cortiça “preguenta”, mas procura-se um conhecimento do risco de ocorrência de híbridos no terreno, podendo assim informar decisões práticas relevantes para o futuro dos povoamentos mistos, dos híbridos e dos sobreiros de cortiça “preguenta”. É nesta terceira determinação que se inscreve o presente trabalho.

C — Abordagem adoptada

Foi a visar um primeiro levantamento de marcadores genéticos do hibridismo entre sobreiro e azinheira, com os quais se obtivesse uma estimativa inicial da incidência de híbridos em alguns montados mistos do Alentejo, que foi aprovado em 1997 o projecto 8153 do programa PAMAF (Instituto Nacional de Investigação Agrária), coordenado pela Prof^ª Carola Meierrose, do Departamento de Biologia da Universidade de Évora, e onde participaram a Universidade de Évora, a Estação Florestal Nacional e a Direcção Regional de Agricultura do Alentejo. A opção recaiu sobre identificar *loci* enzimáticos, na hipótese que a variação interspecífica em alguns deles fosse diagnosticante das duas espécies e dos seus híbridos: nessa altura, a análise do DNA praticamente não era feita em sobreiro, nem sequer internacionalmente¹, e a capacidade para grandes amostragens, determinante para acções futuras de rastreio da incidência de hibridismo a nível nacional, ainda hoje permanece como uma grande vantagem dos marcadores enzimáticos.

Para observar a ocorrência de novos híbridos, seleccionaram-se 3 povoamentos mistos onde em 1998 se realizou uma amostragem de frutos de ambas as espécies, e sua germinação e criação em viveiro. O mesmo se realizou em povoamentos de referência (“puros” de sobreiro ou azinheira) cuja localização geográfica excluiria *a priori* o contacto com a outra espécie. As jovens plantas obtidas constituíram a maior parte do material analisado, mas essa análise incluiu também os adultos dos povoamentos mistos, não só para eventualmente detectar hibridismo nessa geração com os marcadores utilizados, mas também para que, pela verificação dos genótipos das descendências, se pudesse confirmar o parentesco familiar, medida especialmente importante porque os frutos

¹ Data de 2003 a primeira publicação com marcadores de DNA nuclear potencialmente diagnosticantes entre sobreiro e azinheira [Soto et al. 2003].

foram colhidos no chão. Deste modo, cada adulto dentro dos povoamentos delimitados foi marcado e numerado. Finalmente, e para constituírem uma referência, deu-se início a uma inventariação de híbridos, donde também se recolheram descendências para análise.

O mesmo projecto conjugou a análise isoenzimática com um registo da floração e frutificação dos adultos. Assume-se que a possibilidade de ocorrência de hibridismo é tanto maior quanto maior a sobreposição das épocas de floração das duas espécies em cada ano. As azinheiras precedem em algumas semanas os sobreiros, mas essa separação é um valor médio que pode variar de ano para ano, por exemplo com a temperatura [Brandão 1996, Cecich 1997a], e tem pouco significado prático por causa da substancial variação intra-específica entre os momentos de floração individuais, tanto numa espécie como na outra. Assim, a marcação dos adultos em cada povoamento misto também permitiu registar a fenologia da floração de cada indivíduo, para o ano de 1998, na hipótese de se poder definir, em função da proximidade temporal da floração duma árvore em relação às da outra espécie, onde seria *a priori* mais provável encontrar descendências híbridas.

A presente dissertação refere-se principalmente à componente de análise isoenzimática deste projecto. Com uma implementação metodológica projectada para a capacidade futura de processar amostragens de grandes dimensões, identificaram-se marcadores genéticos para a distinção entre sobreiro e azinheira e seus híbridos, e a sua análise nas descendências, para além de ter visado a detecção de híbridos, também permitiu, com carácter preliminar, a caracterização da biologia de reprodução das duas espécies e dos híbridos.