

Parte I: Amostragem

A — Povoamentos mistos

Seleccionaram-se três povoamentos: no pólo da Mitra da Universidade de Évora (Valverde), na Herdade de Feijoas do Ramos (Torre de Coelheiros) e na Herdade de Alfaiates (entre Oriola e Santana, concelho de Portel). As distâncias entre eles são, aproximadamente, 25 Km entre Mitra e Feijoas, 40 Km entre Mitra e Alfaiates, e 15 Km entre Feijoas e Alfaiates.

As parcelas de Mitra e Feijoas foram delimitadas arbitrariamente em redor dum sobreiro (que foi a respectiva árvore número 1) de modo a abranger-se em seu redor um número equilibrado de adultos das duas espécies em estudo. Em ambas há zonas onde predomina azinheira ou sobreiro, mas a proximidade das duas espécies é muito grande para todas as árvores. Alfaiates é uma pequena mancha contendo 20 sobreiros disseminados entre azinheiras, num povoamento onde estas predominam largamente (Apêndice I, secções A1 e B1-3).

A maior parte dos sobreiros destes povoamentos encontram-se em fase de exploração de cortiça amadia, e presume-se que as azinheiras, pelo diâmetro do tronco, tenham uma idade comparável. Em todos existem árvores jovens, que (excepto algumas em Mitra) não foram marcadas.

Os solos são “mediterrânico pardo de xistos e grauvaques” em Feijoas e Alfaiates, neste último em fase delgada, e “litossólico não-húmico de gneisses ou rochas afins” na Mitra.

Como é detalhado na tabela 3.1, um total de 156 árvores adultas (91 sobreiros e 65 azinheiras) foram marcadas no conjunto destas parcelas, e na frutificação de 1998 fez-se a amostragem das descendências de 89 delas, de que se analisaram ao todo 1141 plantas.

Tabela 3.1 — Localização dos povoamentos mistos seleccionados (cf. Apêndice I secção A1) e respectiva amostragem (adultos e plantas das sementes produzidas em 1998) que foi objecto de análise.

Propriedad e	Localização	Topónimo de referência	Sobreiros analisados	Azinheiras analisadas
Mitra	38° 31,7' N 8° 01,4' W	Universidade de Évora/Valverde	39 adultos e 19 descendências (125 plantas)	25 adultos e 19 descendências (200 plantas)
Feijoas do Ramos	38° 23,6' N 7° 51,3' W	Torre de Coelheiros	32 adultos e 16 descendências (187 plantas)	20 adultos e 11 descendências (90 plantas)
Alfaiates	38° 17,3' N 7° 50,9' W	Santana	20 adultos e 14 descendências (348 plantas)	20 adultos e 10 descendências (191 plantas)

Também se fez a análise de 77 plantas da frutificação de 1997 na Mitra.

B — Populações de referência

1) Montados puros

A definição de “puro” para uma parcela de referência, para além da que é usualmente utilizada com base na observação de praticamente 100% de árvores duma das espécies a considerar, implicava escolher parcelas suficientemente afastadas da ocorrência natural da outra espécie de modo a garantir com alguma segurança que a possibilidade de hibridismo seria bastante reduzida, actualmente como no passado pelo menos mais próximo. Embora as características de dispersão destas espécies tornem essa garantia virtualmente inatingível, a localização das três populações seleccionadas é bastante afastada dos limites de distribuição da outra espécie, o que pode constituir uma garantia adicional de “pureza” (tabela 3.2).

A identificação das plantas de Monte Branco, no viveiro, era “Santiago do Cacém”, e é essa a que se utilizou durante o trabalho.

Foi recomendado à Direcção Regional de Agricultura do Alentejo, que se encarregou destas colheitas de semente, que apenas algumas sementes fossem colhidas por árvore de modo a assegurar uma boa representação da diversidade genética de cada população.

Tabela 3.2 — Localização das parcelas de referência e número de plantas objecto de análise. À direita, referência à distribuição de sobreiros (verde) e azinheiras (laranja) [Atlas do Ambiente 1977].

Propriedade	Localização	Topónimo	Amostragem
Monte Branco	38° 01' N 8° 37' W	S. Bartolomeu da Serra (Mata Nacional de Sines)	Montado puro de sobreiro, 217 plantas
Azeiteiros	39° 05' N 7° 07' W	N.º S.º Degolados, Campo Maior	Montado puro de azinho, 233 plantas
Testa	37° 36' N 8° 04' W	Outeiro, Rosário	Montado puro de azinho, 147 plantas



2) Projecto FAIR 1 CT 0202/95

Foi feita uma amostragem exploratória de plantas de sobreiros do projecto FAIR 1 CT 0202 [Varela 2003], representativa de parcelas em geral puras abrangendo toda a área de distribuição natural da espécie (essencialmente, a bacia ocidental do Mar Mediterrâneo). Este material foi obtido durante a frutificação de 1996, transplantado em 1998 para as parcelas definitivas, duma das quais (Herdade da Fava, Ermidas do Sado) se colheu o material foliar analisado, num total de 42 plantas.

C — Híbridos

Ao longo do projecto estudaram-se 9 árvores que se confirmaram, pela análise isoenzimática, serem híbridos. Apenas 3 foram indicadas pela Direcção Regional de Agricultura do Alentejo (a de Sesmarias e as de Outeiro) a tempo de obter as respectivas descendências na frutificação de 1998. À medida que se ia indagando junto de proprietários, caseiros, técnicos e guardas florestais e outros, foi sendo feito o reconhecimento e registada a localização doutras árvores mais ou menos evidentemente coincidentes com o tipo híbrido, das quais 6 foram confirmadas por análise electroforética (tabela 3.3). Em 2003 conseguiu-se uma amostra de pólen de 3 destas árvores (SES, ALC e CAB, cf. Apêndice II secção E).

Exceptuando VR, relativamente isolada (mas a menos de 1 Km dum montado misto), cada uma destas árvores tinha na sua imediata proximidade azinheiras (ALC, MRM, SES, SM1–4) ou sobreiros (CAB, MRM, SM4).

Tabela 3.3 — Abreviatura, localização e morfologia geral dos híbridos (cf. Apêndice I secções A2 e C2), e amostragem de descendências (frutificação de 1998) e pólen (Primavera de 2003).

Abrev.	Propriedade	Localização	Topónimo de referência	Morfologia	Amostragem
ALC	Alcarou de Baixo	38°50,4'N 8°02,2'W	Pavia	Árvore desenvolvida, casca suberosa	pólen
CAB	Mata Nac. de Cabeção	38°57,9'N 8°06,0'W	Cabeção	Árvore desenvolvida, casca suberosa	pólen
MRM	Marmeleira	38°47,5'N 7°42,1'W	Évoramonte (apeadeiro)	Árvore desenvolvida, casca fina	
SES	Sesmarias	38°17,5'N 8°00,3'W	Alvito	Árvore desenvolvida, casca suberosa	13 plantas pólen
SM1	Outeiro	38°27,0'N 7°55,0'W	S. Marcos da Abóbada	Árvore desenvolvida, casca suberosa	42 plantas
SM2	Outeiro	38°27,0'N 7°55,1'W	S. Marcos da Abóbada	Árvore desenvolvida, casca pouco suberosa	45 plantas
SM3	S. Marcos	38°26,1'N 7°53,9'W	S. Marcos da Abóbada	Árvore desenvolvida, casca fina	
SM4	S. Marcos	38°25,9'N 7°54,2'W	S. Marcos da Abóbada	Árvore jovem, produtora de semente, casca fina	
VR	Vale de el-rei	38°54,6'N 8°00,0'W	Malarranha	5 rebentamentos de toijas com algumas décadas de desenvolvimento, casca fina	

D — Sobreiros de cortiça preguenta

Os 3 povoamentos seleccionados encontram-se na Herdade de Montinho (Nossa Senhora de Machede, Évora), Herdade de Vale do Rico Homem (São Manços, Portel) e Herdade de Chaminé (Mora), e em todos predominam sobreiros adultos, em fase de produção de cortiça amadia. Conforme a recomendação da Direcção Regional de Agricultura do Alentejo, a visita inicial às duas primeiras coincidiu com a tiragem da cortiça, o que permitiu junto dos tiradores aprender a reconhecer pelo entrecasco as árvores cuja cortiça fosse mais manifestamente preguenta. Neste bloco de amostragem contam-se assim 15, 2 e 18 árvores, respectivamente. A amostragem incidiu essencialmente em árvores de cortiça preguenta, e, como tendiam a concentrar-se em manchas relativamente compactas, uma visita posterior à H^e. Montinho, aumentou a amostragem numa pequena zona desta parcela de 15 para 20 árvores (cf. Apêndice I secções A3 e B4). A cortiça destas últimas não foi considerada tão marcadamente preguenta.

E — Outras espécies

Amostras de folhas foram colhidas de indivíduos adultos de várias espécies da ordem Fagales (tabela 3.4):

Tabela 3.4 — Lista doutros táxones amostrados expressamente para enquadramento comparativo de sobreiro e azinheira analisados, e locais de colheita respectivos. O número de indivíduos de cada táxone é dado na última coluna.

Espécie	Colheita	Nº
<i>Betula pubescens</i> subsp. <i>celtiberica</i> (Rothm. & Vasc.) Rivas Martinez	Jardim Botânico da Universidade de Lisboa	2
<i>Castanea sativa</i> Mill.	Parque Natural da Serra de São Mamede	2
<i>Casuarina cunninghamiana</i> Miq.	Jardim-Museu Agrícola Tropical	2
<i>Corynecarpus laevigata</i> JR & G Forst	Jardim Botânico da Universidade de Lisboa	2
<i>Fagus sylvatica</i> L.	Jardim Botânico da Universidade de Lisboa	2
<i>Juglans regia</i> L.	Jardim Botânico da Universidade de Lisboa	2
<i>Myrica faya</i> Ait.	Jardim Botânico da Universidade de Lisboa	2
<i>Quercus alnifolia</i> Poech	Jardim Botânico da Universidade de Lisboa	1
<i>Quercus canariensis</i> Willd.	Jardim Botânico da Universidade de Lisboa	1
<i>Quercus coccifera</i> L.	Jardim Botânico da Universidade de Lisboa	1
<i>Quercus ilex</i> L. ssp. <i>ilex</i>	Jardim Botânico da Universidade de Lisboa	1
<i>Quercus libani</i> Olivier	Jardim Botânico da Universidade de Lisboa	1
<i>Quercus pyrenaica</i> Willd.	Parque Natural da Serra de São Mamede	2
<i>Quercus rubra</i> L.	Mata Nacional de Cabeção	1
<i>Quercus suber</i> L.	Parque Natural da Serra de São Mamede	1

Outras análises abrangeram um âmbito muito mais alargado de espécies, mas como o seu interesse é marginal ao presente trabalho, só se listam as mais relevantes na correspondente secção dos resultados (cf. “Resultados” parte IV secção B).

Parte II: Material vegetal utilizado

A — Plantas criadas em viveiro

1) Colheita de sementes

Realizou-se a colheita de sementes para criação em viveiro maioritariamente durante a frutificação de 1998, totalmente a cargo da Direcção Regional de Agricultura do Alentejo e da Estação Florestal Nacional, embora na de 1997 as de algumas azinheiras do povoamento da Mitra também fossem aproveitadas pelo autor.

Nos povoamentos de referência (Monte Branco, Azeiteiros e Testa) colheram-se lotes de sementes do chão, apenas com a recomendação de que apenas algumas fossem colhidas debaixo de cada árvore para na medida do possível aproximar a uma amostragem homogénea de cada um.

Já nas parcelas mistas, a mesma prática de colher do chão acarretou problemas de identificação entre cada adulto e as descendências que lhe eram atribuídas. Esta questão tornava-se tanto mais relevante quanto maior fosse a densidade local, ou mais altas as árvores, ou onde houvesse inclinação do terreno. Como é detalhado nos mapas destes povoamentos (Apêndice I-B), na Mitra o quadrante sueste é particularmente denso, assim como o são pequenas manchas de Feijoas (árvores 16–18 e 52, 26–28); algumas árvores, sobreiros em todos os casos, eram bastante altas (na Mitra, 2, 3, 5, 8, 10, 11, 16, 24, 27, 31; em Feijoas, 10, 17, 39, 41, 44, 46); e no caso da Mitra há um declive importante, especialmente pronunciado no quadrante sueste e descendo na direcção de SSE para NNW, suavizando até à árvore 12, enquanto em Alfaiates pode dizer-se que todas as árvores se situam num declive acentuado, descendo no sentido de ESE para WNW. Conclui-se por isso que em qualquer um destes povoamentos era provável haver contaminantes de família para família, detectáveis visualmente só quando entre espécies diferentes.

A amostragem de 1998 não abrangeu todas as famílias presentes, apesar de (pelo menos para sobreiro) ter sido um ano de boa produção de sementes; juntando a tendência de só as sementes caídas mais recentemente estarem disponíveis, especialmente onde há pastoreio, à provável dispersão temporal da deiscência, entre árvores, uma amostragem exaustiva iria exigir várias visitas a cada um dos povoamentos mistos, que não foi possível realizar. Mesmo assim (tabela 3.1) pouco mais de metade das árvores de cada espécie, em cada parcela, estiveram representadas por

descendências.

2) Criação em viveiro

As sementes foram transferidas para os Viveiros de Santo Isidro (Pegões) onde foram logo semeadas segundo as especificações de Varela *et al.* [2003a], excepto na utilização de turfa em vez de casca de pinheiro, como substrato. Cada tabuleiro compõe-se de 50 alvéolos, e em regra continha plantas duma única origem (família ou lote), identificada com etiquetas plásticas amarelas (cf. Apêndice I-C1). A taxa de germinação não foi determinada, mas em regra a maior parte dos alvéolos estavam ocupados com uma planta.

A Estação Florestal Nacional fez um mapa dos tabuleiros para facilitar o trabalho de localização das sementeiras das diferentes origens.

Era notória a variação no crescimento entre plantas dum mesmo tabuleiro. Também se observaram, na Primavera de 1999, algumas plantas albinas (descendentes dos sobreiros 11, 18 e 24 da Mitra), as quais foram analisadas apenas a título de curiosidade (série de extracções número 7), verificando-se que também expressam as actividades enzimáticas em análise. São muito mais fáceis de macerar e dão um extracto esbranquiçado, excepto algumas que apresentavam um pigmento carmim e que no extracto passava a verde.

3) Colheita de folhas

Para que fosse possível colher as folhas e obter os extractos no mesmo dia, foi necessário manter os tabuleiros com plantas na Universidade de Évora, em estufas no pólo da Mitra, com rega diária por aspersão. O transporte dos Viveiros de Santo Isidro para a Mitra e volta era a cargo do viveirista e programado conforme o avanço no processamento dos tabuleiros existentes e o espaço disponível nestas estufas. Os tabuleiros que eram pedidos de cada vez ao viveirista eram identificados em função do mapa de sementeiras elaborado pela Estação Florestal Nacional (cf. secção anterior).

Numerou-se cada tabuleiro que era processado numa sequência numérica que atingiu o número 133 (14,89 plantas por tabuleiro, em média), colocando uma etiqueta com tinta impermeável num dos lados. A identificação dos tabuleiros já processados ficava assim assegurada, e a sua orientação também, de modo a tornar possível repetir a amostragem de qualquer planta.

As folhas eram retiradas à mão para dentro de sacos de plástico previamente identificados com marcador de feltro, indicando o número

do tabuleiro e o alvéolo, este referenciado a uma esquadilha conforme é esquematizado na figura 3.1. O número de sacos a utilizar em cada dia era previamente determinado pela quantidade de tempo calculada como disponível para as extracções a realizar nesse mesmo dia. Se por alguma razão as folhas colhidas não fossem processadas, as plantas em questão eram reamostradas.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1									
2									
3									
4									
5									
6									

Figura 3.1 — Esquema dum tabuleiro utilizado para a sementeira e crescimento das descendências incluídas no presente estudo (cf. Apêndice I secção C1). Os alvéolos A2, A5, I2 e I5 nunca estavam preenchidos, pois contêm pontos de apoio para o empilhamento dos tabuleiros.

B — Material colhido directamente do campo

1) Adultos

A colheita de folhas foi realizada pelo autor do presente estudo directamente nas próprias árvores, observando os mesmos princípios descritos na secção imediatamente precedente no que respeita à identificação dos sacos e dimensionamento da amostragem a fazer em cada dia.

Obteve-se pelo menos uma vez um extracto de folhas de todas as árvores originalmente marcadas nos povoamentos mistos, enquanto dos híbridos foi obtido em geral mais do que um.

2) Sementes

A amostragem de sementes para electroforese foi realizada no Outono de 2000 pelo autor do presente estudo, colhendo-se directamente da árvore. Introduzidas em sacos de plástico devidamente identificados quanto à origem, eram processadas no próprio dia ou no dia seguinte.

C — Codificação das amostras

Procurou-se que não fosse possível, pela disposição das amostras nos geis, identificar a sua origem (isto é, o povoamento e a família), o que

pareceu desde logo importante para que, em futuras aplicações de rastreio, a avaliação dos zimogramas não fosse condicionada por essa informação. Convinha apenas manter a distinção entre sobreiro, azinheira e híbrido, em referência à indicação de origem em cada caixa, para assegurar um número equilibrado das duas espécies em cada gel.

Houve três níveis de codificação, o primeiro para identificar as plantas de viveiro e árvores-mãe respectivas, o segundo para identificar cada tabuleiro, e o terceiro para identificar os extractos enzimáticos. Estas codificações só se cruzavam no registo das extracções, permitindo que a análise dos resultados de cada electroforese se fizesse sem conhecimento da origem de cada extracto. As regras utilizadas foram as seguintes:

Primeiro nível

Esta codificação dizia respeito à identificação de cada adulto, família, ou lote, feita no acto da sementeira e assinalada por uma etiqueta de plástico amarela enterrada num dos alvéolos:

- Populações de referência: Santiago do Cacém (sobreiros de Monte Branco), Azeiteiros/ Campo Maior (azinheiras) e Testa¹ (azinheiras). Nalguns registos usou-se a letra R seguida de c (“cork”) ou h (“holm”), donde Rc, Rh1 e Rh2, respectivamente [Oliveira *et al.* 2003].
- Parcelas mistas: uma letra designando a parcela (M para Mitra, F para Feijoas do Ramos e A para Alfaiates), seguida do número da árvore-mãe respectiva, segundo a marcação feita *in loco*, representada nos mapas respectivos (cf. Apêndice I-B). Por exemplo, F32 designava um tabuleiro contendo descendência da azinheira 32 em Feijoas do Ramos, mas também essa mesma azinheira.
- Híbridos: SM1 e SM2 (H^e. Outeiro²), e SES (Sesmarias).

Segundo nível

Numeração dos tabuleiros, feita sequencialmente à medida que se iam fazendo as extracções (#1 até #133), com a identificação do alvéolo ocupado por cada planta. Para essa identificação, a letra designando a coluna do alvéolo era minúscula se se tratava de proveniência de azinheira, ou maiúscula em todos os restantes casos, independentemente da aparência da planta sugerir ser azinheira ou sobreiro.

¹ Nalguns casos, mas por engano, “Testos”

² Originalmente, “São Marcos”, daí a abreviatura SM.

Terceiro nível

Amostras ordenadas por séries numéricas (1 a 43), cada série correspondendo a uma preparação única do meio de extracção. Caso acontecesse algum problema técnico relacionado com o passo de extracção, ele poderia ser identificado como tal pelo facto das amostras trazerem o mesmo número de série. Apenas no caso das árvores híbridas (ou suspeitas de tal) se adoptou uma numeração à parte, sequencial desde X1 até X28.

Dentro das séries, as amostras de sobreiro eram identificadas individualmente com uma letra maiúscula, por exemplo 22C (amostra C da série 22), enquanto para as de azinheira a letra era minúscula, por exemplo 31t (amostra t da série 31). No final do alfabeto, a Z seguia-se AA, AB, etc., e a AZ seguia-se BA, etc.. No caso das descendências de híbridos, em lugar da letra utilizava-se um número, separado do de série por um ponto, por exemplo 33.13 (amostra 13 da série 33).

Com este sistema, sempre que houvesse mais de uma extracção da mesma planta, a codificação de cada réplica era diferente: por exemplo, 28f e 42a designaram as duas extracções da árvore adulta A11 (número 11 de Alfaiates).

No caso das plantas adultas, não havia lugar à identificação dos alvéolos e das caixas, bastando o número da árvore e a parcela a que pertencia, e no caso dos híbridos a respectiva abreviatura (cf. parte I secção C), portanto nestes casos fazia-se uma relação directa entre o 3º e o 1º nível de codificação.

Descodificação

O ordenamento das amostras no gel de eletroforese baseava-se em princípio no ordenamento das séries, em geral em grupos de 10 azinheiras alternados com grupos de 10 sobreiros, com um espaço a separar os grupos entre si. Para dar um exemplo típico deste arranjo, num gel foram ordenadas sucessivamente as amostras 29a até 29j, 29A–J, 29k–t e 29K–T. Consultando o registo de extracções (tabela 3.5), neste gel as amostras de azinheira eram do tabuleiro #30 (alvéolos b3–i6), de Testa, e do tabuleiro #31 (alvéolos a1 e a3), de Azeiteiros, enquanto as de sobreiro eram todas do tabuleiro #29 (alvéolos A1–F5), de sementes colhidas sob o sobreiro A9. Note-se que só neste registo de extracções se pode recuperar a proveniência de cada amostra.

Tabela 3.5 — Transcrição de parte do registo da série de extracções número 29. Cada uma das 5 colunas contém, sucessivamente, a designação da amostra (3º nível), alvéolo da planta correspondente e número do tabuleiro (2º nível). A identificação da origem de cada tabuleiro (1º nível) é indicada no texto que serve de cabeçalho à identificação das amostras. Por exemplo, a amostra 29m é uma azinheira que ocupava o alvéolo f6 do tabuleiro #30, de material proveniente do povoamento de referência Testa.

7 FEV 2000

Início e conclusão dos contentores³ #29 e #30 de Alfaiates 9 e Testa respectivamente, início do #31 de Azeiteiros.

29A	A1	#29	29M	D6	#29	29Y	G6	#29	29e	c3	#30	29q	i4	#30
29B	A4		29N	E2		29Z	H1		29f	c4		29r	i6	
29C	B2		29O	E3		29AA	H4		29g	c5		29s	a1	#31
29D	B3		29P	E5		29AB	H5		29h	c6		29t	a3	
29E	C1		29Q	E6		29AC	H6		29i	e3		29u	a4	
29F	C2		29R	F3		29AD	I1		29j	e4		29v	a6	
29G	C3		29S	F4		29AE	I3		29k	f3		29w	b1	
29H	C5		29T	F5		29AF	I6		29l	f4		29x	b2	
29I	D1		29U	F6		29a	b3	#30	29m	f6		29y	b3	
29J	D2		29V	G2		29b	b4		29n	h2		29z	b4	
29K	D3		29W	G3		29c	b6		29o	h3		29aa	b5	
29L	D5		29X	G5		29d	c2		29p	h4		29ab	b6	

D — Fases da análise

Da frutificação de 1998 obtiveram-se descendências de 49 sobreiros e de 40 azinheiras das parcelas mistas, distribuídas conforme descrito na tabela 3.6 (e também na tabela 3.1).

A estratégia inicial era analisar pelo menos uma caixa inteira, isto é, algumas dezenas de plantas (tipicamente entre 25 e 45), por família. Mas o número de famílias era muito elevado e, face aos resultados, optou-se a partir de certa altura por rentabilizar melhor o esforço analisando menos exemplares de cada uma. Esta decisão justificou-se, tendo em conta os objectivos traçados, por três ordens de razões:

i) A amostragem dalgumas dezenas por família não pareceu um requisito importante: já sendo aparente a raridade de híbridos nesta frutificação, só com amostragens de centenas de indivíduos por família poderia haver uma esperança razoável de conseguirem-se distinguir as árvores-mãe em termos de susceptibilidade de os produzirem;

ii) A ocorrência ocasional de contaminantes entre as famílias, fossem eles mais evidentes nos casos de plantas de azinheira entre sobreiros ou vice-versa, ou mais subtis quando revelados por incongruências entre gerações em *loci* polimórficos (casos em que a planta não expressava qualquer dos alelos existentes na presumida árvore-mãe), e que não era

³ leia-se: tabuleiros.

inesperada pelo facto das sementes terem sido colhidas do solo (cf. secção A1), levou a que não pudesse ser atribuída grande fiabilidade à filiação de cada planta, pelo que era destituída de qualquer sentido a individualização de cada família para a detecção de hibridismo. Em princípio, cada parcela teria de ser analisada globalmente;

iii) Parecendo ser a hibridação um evento raro, seria porventura mais útil assumir que se distribui quasi-uniformemente pelas árvores da parcela, levando à necessidade de cobrir toda a superfície da mesma, isto é, analisando representantes de todas as famílias disponíveis.

Assim, as famílias estiveram representadas em dois níveis de amostragem: as inicialmente analisadas, com maior representação (descendentes das árvores 1, 13, 32, 37 e 60 da Mitra, 27, 28 e 34 de Feijoas, e 8, 9, 12, 20, 21, 29, 30, 31, 34, 36 e 38 de Alfaiates), e as restantes 70 famílias com representação bastante limitada (cf. Apêndice IV-A).

Tabela 3.6 — Distribuição das descendências disponíveis para análise pelas parcelas mistas em estudo, destacando o número de árvores-mãe marcadas de cada espécie, o número destas que na frutificação de 1998 deram frutos, constituindo famílias de meio-irmãos, e o número de amostras dessas famílias que foram analisadas.

Parcela	Árvores-mãe					
	Sobreiros			Azinheiras		
	Marcados	Famílias	Amostras	Marcadas	Famílias	Amostras
Mitra	39	19	125	25	19	200
Feijoas	32	16	187	20	11	90
Alfaiates	20	14	348	20	10	191
Total	85	49	660	64	40	481

Parte III: Obtenção de extractos enzimáticos e sua conservação

A — Opções tomadas

Primeira: material foliar como base da análise.

Vantagens: disponível durante todo o ano, acesso relativamente fácil (excepto em alguns sobreiros adultos com fuste mais elevado!), organismos contaminantes sem relevância.

A alternativa, em plantas jovens, seriam as raízes, menos fáceis de aceder sem perturbar as plantas, e pelo menos teoricamente passíveis de albergar fungos ectomicorrízicos.

Desvantagens: presença de compostos inibidores de actividades enzimáticas.

Este aspecto ocupou uma parte substancial do trabalho, mas ao ser ultrapassado permitiu evidenciar todas as vantagens referidas, especialmente importantes para amostragens na ordem dos milhares.

A possibilidade de utilizar as sementes colhidas das árvores foi explorada na frutificação de 2000. Constatou-se ser possível obter a mesma quantidade (400 mg) de material da extremidade dos cotilédones (distal ao estigma) para produzir extractos, sem prejuízo da capacidade germinativa das sementes (até estimulando o processo de germinação).

Segunda: adaptação dos dois passos de processamento de cada amostra, a extracção de enzimas e a separação electroforética, para análises em larga escala. A experimentação com estes dois passos justificava-se pela necessidade de processar muitas amostras, resultante da possível raridade de ocorrência de híbridos espontâneos, e da expectativa de alelos infrequentes que pudessem dificultar o estabelecimento de critérios fiáveis de discriminação. Adicionalmente, foi necessária para satisfazer o objectivo de assegurar que todas as actividades enzimáticas discriminantes fossem reveladas, conjuntamente à resolução de dificuldades inicialmente encontradas [Branco, 2000], especialmente no passo de extracção.

Resultou assim num protocolo original que permitiu levar a cabo as análises pretendidas em suficiente profundidade (cf. parte B, e Apêndice III-A1).

Terceira: conservação das actividades enzimáticas a -20°C . A relativa morosidade do processo de extracção de enzimas justificava a preferência

por conservar as actividades enzimáticas para possibilitar, dentro de um período de algumas semanas, a análise em diferentes sistemas electroforéticos e eventuais repetições para confirmar observações. A temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi considerada preferível aos $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ porque permitia manter as amostras sempre em estado líquido (com a ajuda dos anticongelantes glicerol ou glicol de etileno), deste modo reduzindo o impacto de sucessivas utilizações.

Alternativas

As opções acima descritas justificam-se principalmente pela estratégia que à partida se estabeleceu, no projecto PAMAF 8153, de adequar a metodologia a futuros rastreios em larga escala, para a detecção de híbridos em materiais de propagação.

A literatura de análise isoenzimática em *Quercus* spp., e nomeadamente em sobreiro, evidencia tendências diferentes das do presente trabalho. Em primeiro lugar, e à excepção dos trabalhos do grupo da Universidade de Montpellier orientado pela Prof^a Lumaret, e seus associados [Yacine e Lumaret 1989, Ellena-Rossellò *et al.* 1992, 1996, 1997, Michaud *et al.* 1995, Toumi & Lumaret 1998, Lumaret *et al.* 2005], o material de trabalho raramente consiste de folhas, optando os autores por trabalhar com gemas foliares ou raízes [Von Wühlisch & Muhs 1995, Jimenez *et al.*, 1999] ou com pólen [Nóbrega 1997]. Dado que a estratégia de amostragem assentava na análise de plantas criadas em viveiro, que não têm floração, e por causa das complicações potenciais com a presença de fungos ectomicorrízicos nas árvores adultas, apenas seria aplicável usar gemas ou folhas no presente trabalho. Por seu lado as gemas constituíam à partida apenas uma solução de recurso, pois para obter material suficiente é necessário acumular várias por indivíduo, o que no caso das plantas criadas em viveiro poderia ser destrutivo.

No caso das folhas tentou-se aplicar o único protocolo detalhado publicado pelo grupo de Montpellier [Yacine & Lumaret 1989], que após um passo de maceração num almofariz com areia, à temperatura ambiente, prossegue pela dissolução em tampão Tris contendo 2-mercaptoetanol e polivinilpolipirrolidona, e conservação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. No entanto, e por motivos que não foi possível determinar, este protocolo nunca deu resultados neste trabalho, o que levou a optar pela via de investigação de um protocolo original referida acima⁴. Só já depois de ter

⁴ Pelo menos no polimorfismo num *locus* de sobreiro para a isomerase da glucose 6-fosfato (PGI) parece haver total concordância entre o que é publicado por Toumi e Lumaret [1998]

sido completado o trabalho laboratorial houve finalmente acesso ao protocolo usado com carvalhos americanos [Mitton et al. 1977, Sork *et al.* 1993b].

B — Método

1) Composição do meio de extracção

Sistema tampão

L-histidina e ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), a 25 mM cada.

A escolha deste sistema levou em conta a eficiência de tamponização, pela combinação de valores adequados de pK_a (6,0 e 6,9 respectivamente) e de tendências opostas do equilíbrio ácido-base no intervalo entre esses valores (+1 e -1 respectivamente [Skopes 1987]). Foi assim possível utilizar concentrações relativamente baixas das duas substâncias e ao mesmo tempo garantir um valor de pH final próximo de 6,5 (a solução tinha um pH final entre 6,5 e 6,7, e após a obtenção do extracto permanecia entre os 6,0 e 6,5). Estes valores de pH são conforme o sugerido por Loomis & Bataille [1966], no sentido de controlar-se a ionização dos taninos sem afastar muito do pH citoplásmico: os taninos ionizam-se à medida que o pH sobe a partir do valor 3, e uma vez ionizados (o que se reconhece facilmente pela sua intensa cor castanha tom de café) estabelecem ligações covalentes com uma grande variedade de grupos funcionais nas estruturas proteicas, inactivando os enzimas [Loomis & Bataille 1966, Loomis 1974].

Adsorventes de substâncias inactivadoras

Polivinilpirrolidona solúvel (PVP40) a 12,5% (w/v) e albumina de soro de bovino (BSA, fracção V) a 0,2% (w/v).

A polivinilpirrolidona é o adsorvente de taninos mais utilizado [Anderson 1968, Loomis 1974, Kelley & Adams 1977, Mitton *et al.* 1979, Theimer 1983, Kephart 1990, Bult & Kiang 1993, Nóbrega 1997], se bem que a concentrações geralmente da ordem dos 4–5%. Trata-se de um polímero formado por ligações covalentes muito semelhantes à ligação peptídica, assim funcionando em solução como um “tampão” para os

e o registo feito no presente trabalho. É possível que os dois protocolos de extracção enzimática se revelem complementares na preservação de diferentes actividades resolúveis por electroforese, cf. “Discussão” parte IV secção A3.

taninos, que na forma não-ionizada formam ligações por ponte de hidrogénio com as ligações peptídicas das proteínas, o que nem sempre se traduz em inactivação dos enzimas mas acarreta a sua quase completa precipitação [Loomis & Bataille 1966], incompatível com a electroforese. Deste modo, o que conta para a efectividade da PVP40 é a quantidade presente em solução [Loomis & Bataille 1966], necessária a impedir eficazmente a acção dos taninos presentes. Empiricamente, e em função dos melhoramentos que se conseguiam com outros componentes, adoptou-se a utilização de 1 mL de solução contendo PVP40 a 12,5% (w/v), para 400 mg de material foliar (o que se traduz em 31,25% w/w de PVP40 por peso fresco de folhas).

A BSA é indicada como adsorvente geral que pode complementar a PVP40, pois forma complexos com grande variedade de potenciais inibidores de enzimas (iões metálicos, lípidos, taninos simples que não se ligam à PVP40, etc. [Loomis 1974, Theimer 1983, Skopes 1987, Kephart 1990]).

Antioxidantes, permeabilizadores

Ascorbato de sódio a 250 mM e ditioneína (DTT) a 5 mM, e tetraacetato dissódico de etilenodiamina (EDTA) a 10 mM.

Os dois primeiros são inibidores da propagação de radicais livres (de Oxigénio e de Enxofre respectivamente) em solução, enquanto o EDTA é um quelante de catiões divalentes, também importante para a acção dos antioxidantes, e que reduz a estabilidade das membranas celulares por remoção do Magnésio, deste modo permeabilizando-as para maior eficácia de homogeneização [Penefsky & Tzagoloff 1971, Theimer 1983, Skopes 1987].

Conservantes

Glicol de etileno a 25% (v/v), anticongelante, e sulfóxido de metilo (DMSO) a 8% (v/v), inibidor a longo prazo da propagação de radicais livres de Oxigénio [Krungrai *et al.* 1990] e um cocktail de inibidores de proteases (Apêndice III secção C2) [Ryan, & Walker-Simmons 1981, Black *et al.* 1989, DiStefano *et al.* 1997].

Outras substâncias foram experimentadas, por virem citadas frequentemente na bibliografia de extracção de enzimas (cf. “Revisão bibliográfica”, parte IV, secção C2), mas sem vantagens aparentes ou mesmo com piores resultados: como potenciais inibidores da acção dos taninos há a referir a polivinilpolipirrolidona (insolúvel), o tetraborato de sódio, o óxido de germânio e o fenoxietanol, ou ainda o metabissulfito de

sódio ou de potássio; como inibidores das tirosinases (polifenoloxidasas), para complemento dos inibidores da acção dos taninos, o dietilditiocarbamato de sódio, o cianeto de potássio, ou a azida de sódio; como antioxidantes, o 2-mercaptoetanol ou a glutatona; o anticongelante glicerol; como permeabilizadores de membrana, os detergentes CHAPS ou Triton X-100; como estabilizadores gerais dos enzimas, a sacarose ou o cloreto de potássio. Em praticamente todos os casos utilizaram-se as concentrações recomendadas nas referências bibliográficas.

2) Procedimento

Folhas

A amostragem de cada indivíduo consistia dalgumas folhas colhidas no próprio dia, em número de 2 se fossem grandes até 6 ou 7 se fossem pequenas.

Pesagem. Tanto quanto possível evitavam-se folhas com parasitas, defeitos ou áreas necrosadas. Para cada amostra, após retirarem-se os pecíolos e limpar-se a superfície, pesavam-se cerca de 400 mg (limbos intactos sempre que possível), que eram colocados num almofariz.

Maceração. Aproximadamente 25 mL de azoto líquido eram vertidos sobre as folhas, que eram maceradas usando o pilão, primeiro com pressão vertical e depois com movimentos circulares. Depois de evaporar-se o azoto, a maceração era repetida para obter um pó tão fino quanto possível. É importante reduzir as folhas a pó (figura 3.2), principalmente no caso das azinheiras jovens, cujas folhas são muito fibrosas.

Na prática, usou-se uma colher de 50 mL para retirar de uma só vez o azoto líquido da garrafa, e distribuíam-se duas metades desse volume por dois almofarizes, apenas um contendo as folhas; para a repetição era suficiente transferir o azoto ainda existente no segundo almofariz.

Suspensão. Imediatamente após a maceração, transferia-se o pó, com a ajuda de uma espátula e um funil, para um tubo de 2 mL (Sarstedt 72689), e sobre ele pipetava-se 1 mL de meio de extracção, agitando o conteúdo de modo a assegurar que todo o pó ficava embebido pelo líquido. Nestas condições, o tubo podia esperar vários minutos no banho de gelo, nomeadamente porque o processamento de amostras era feito em séries de 6.

Homogenização. O conteúdo de cada tubo (macerado de folhas embebido em meio de extracção) era homogenizado durante 10 segundos com um homogenizador de lâminas da marca CAT (Staufen, Alemanha, modelo X120, com sonda T6), à velocidade máxima (30000 rpm) e com

o tubo imerso no banho de gelo. Mais tempo implicava acumulação de calor que pode inactivar enzimas, pelo que para facilitar a homogenização não só era muito importante pulverizar as folhas completamente no passo de maceração em azoto líquido, como a utilização do homogenizador para uma pré-homogenização a velocidade reduzida, geralmente com a duração de 10 a 20 segundos (figura 3.2).

Sedimentação. Centrifugavam-se os tubos com os homogenatos durante 10 minutos a 5000 g e retiravam-se 100 μ L de sobrenadante (de cor amarelo dourado a verde, segundo a proporção de cloroplastos em suspensão, figura 3.2) para um tubo de plástico de 0,5 mL (Sarstedt 72699) contendo 5 μ L de um cocktail de inibidores de proteases e misturava-se bem com leve agitação do tubo, momento em que se concluía a extracção. Nestas condições, os extractos podiam esperar algumas horas em banho de gelo até serem guardados a -20°C .

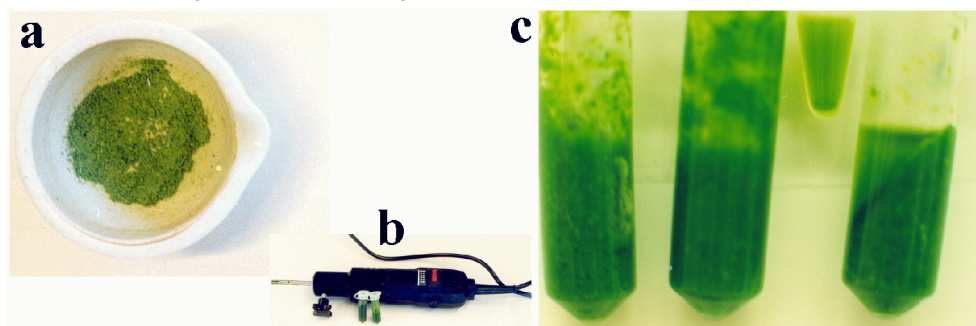


Figura 3.2 — Aspecto do material foliar à medida que era processado. a) Macerado no interior do almofariz. b) Homogenizador e dois tubos de 2 mL contendo o material foliar. c) Detalhe dos tubos onde é colocado o material: os tubos de 2 mL, da esquerda para a direita, contêm o macerado embebido em meio de extracção, o homogenato, e a fase líquida separada após centrifugação; entre estes dois últimos vê-se um tubo cónico de 0,5 mL com o extracto pronto a ser guardado.

Só se processavam, no máximo, 6 amostras por centrifugação, para que nenhuma ficasse à espera demasiado tempo até ao procedimento ficar completo. Além disso, este ritmo de processamento permite 2 pessoas alternarem eficientemente na utilização dos mesmos meios, duplicando o número de amostras que se podem processar para o mesmo período de tempo. Por pessoa, devem projectar-se até um máximo de 36 amostras por dia de trabalho (equivalente a sensivelmente 6 horas), variando conforme a hora a que as folhas podem chegar ao laboratório.

O cocktail de inibidores utilizado era rapidamente preparado à medida que era necessário, com 20% de AEBSF a 10 mM, 20% de E-64 a 1 mM, 20% de iodoacetato a 100 mM, e 40% de EDTA a 0,5 M (percentagens por volume). Estas soluções-mãe eram todas preparadas em água e mantidas a -20°C no caso das de E-64 e iodoacetato, a 4°C para a de

AEBSF e à temperatura ambiente para a de EDTA.

Uma vez preparado, o cocktail era utilizável no prazo de poucos dias se mantido sempre a 4 °C.

Sementes

As únicas diferenças no procedimento são anteriores à maceração. O material que era utilizado para a maceração, também aproximadamente 400 mg por indivíduo, era a extremidade dos cotilédones oposta ao estigma, isto é, a que está virada para a cúpula do fruto, liberto na medida do possível de tecido materno (restos de tegumento) e de vestígios de larvas parasitas (galerias). Pretendia-se, pela selecção desta extremidade, preservar a radícula e epi/hipocótilo assim como a maior parte dos cotilédones, e assim manter o potencial de germinação das sementes. Em 1999 fez-se uma comparação entre a amostragem desta extremidade em comparação com a extremidade oposta, e não se verificaram diferenças no repertório de enzimas reveláveis após electroforese (pelo menos daqueles que foram usados em análises de rotina no presente estudo). Deste modo, e porque a quantidade de 400 mg não constituía, mesmo no caso de sementes mais pequenas, uma perda de material significativa, tornava-se possível analisar o mesmo indivíduo através dos cotilédones e, após germinação, das folhas seja na fase de planta jovem ou já como árvore.

Algumas sementes foram mantidas a 4 °C, imersas em areia, depois da remoção duma parte dos cotilédones, para poder verificar-se mais tarde o seu potencial de germinação. De facto, verificou-se germinação dalgumas sementes processadas desta forma, mas a taxa de germinação não foi determinada.

Cuidados adicionais, que implicavam uma ligeira lentidão do processamento em comparação com o material foliar, incluíam a já referida remoção de material biológico contaminante, assim como cortar o material a utilizar em fatias finas, depois de pesado, para facilitar a maceração. Os extractos de sementes tinham aspecto leitoso, esbranquiçado, às vezes com uma ligeira tonalidade rosada.

Parte IV: electroforeses em gel de amido

A — Preparação do gel

1) Materiais e reagentes

As soluções foram preparadas a partir de reagentes *pro analysis*, excepto nos casos do amido hidrolisado para electroforese e da polivinilpirrolidona (PVP).

A água utilizada nas soluções provinha da canalização pública, sendo submetida a pré-filtragem, sucessivamente por um filtro de partículas e por um filtro de carvão activado, para depois ser desionizada numa resina de troca iónica “mixed bed” (Permutit, Paramus, NJ) [Ganzi 1984, Hill & Lorch 1981]. A qualidade desta água era regulada pela sua condutividade, que no decurso deste trabalho esteve quase sempre nos 0 μS (o máximo tolerável sendo 2 μS).

2) Formação do gel

Solução de amido

Cada gel foi preparado em 300 mL do tampão respectivo (cf. secção B2). A matriz de amido era constituída por uma mistura a 1:1 de dois tipos diferentes de amido hidrolisado [May 1991] obtido da Sigma (números de catálogo S-4501 e S-5651, respectivamente mais consistente e mais fluido), a uma concentração final de 11 % (16,5 g de cada por gel). A concentração escolhida foi o compromisso que se encontrou entre viscosidade da solução no momento da sua transferência para o molde do gel, integridade das fatias de gel após a electroforese, e economia de amido. Os dois primeiros factores são cruciais para o sucesso de cada análise: na concentração de 14% sugerida por May [1991] havia algumas dificuldades em obter repetidamente a desejável uniformidade de consistência e espessura do gel (pelo menos com os materiais utilizados e na prática que a seguir se detalha), devido à excessiva viscosidade da solução, e por outro lado a 10% acontecia facilmente quebrarem-se as fatias que eram separadas após a electroforese. Não houve necessidade de peneirar o amido antes de pesá-lo [May 1991], pois invariavelmente qualquer dos dois tipos se apresentavam sem agregações.

A preparação da matriz de amido envolvia suspendê-lo no tampão,

ferver a solução e desgaseificá-la, para então poder transferir-se para o molde do gel. Existem várias opções para o aquecimento da solução [Kephart 1990], tendo sido preferida a que May [1991] descreve, conforme é detalhado nos dois primeiros passos do protocolo 2 (Apêndice III-A). Como em geral se preparavam 2 geis por dia, poderia optar-se, como refere May [1991], por preparar dois géis a partir de 500 mL de tampão, distribuindo-se a solução sequencialmente pelos dois moldes respectivos. A vantagem mais evidente desta estratégia está na poupança de amido, mas a execução do protocolo tornava-se mais difícil, por isso preferiu-se preparar dois geis de 300 mL separadamente.

Molde do gel

O molde do gel consistia numa placa de vidro temperado (246 mm × 206 mm × 4 mm) sobre a qual se fixavam barras de vidro acrílico com largura de 19 mm, usando molas de escritório, deixando um espaço de 206 mm × 168 mm adequado para a colocação de 40 amostras paralelamente ao lado maior e a produção de três fatias replicadas (gel de 300 mL) [May 1991]. O sistema de barras podia ser disposto de modo a produzir variantes da geometria do gel; por exemplo, quando se estava ainda a investigar o potencial discriminante de cada actividade enzimática e era preferível um maior número de réplicas com menor número de amostras, reduzia-se a área do molde.

Com o arrefecimento dentro do molde sobre uma superfície horizontal, à temperatura ambiente, formava-se o gel. Logo que ganhava opacidade verificava-se se já estaria frio tocando-lhe com as costas dos dedos, e caso estivesse retiravam-se as barras de vidro acrílico, cobria-se com película aderente para impedir que houvesse mais evaporação, e guardava-se a 4 °C até à colocação das amostras. A placa de vidro temperado serve de suporte ao gel até ao fim da electroforese.

A perfeita horizontalidade do molde do gel era previamente verificada com um nível de bolha. Um gel de espessura variável tem diferenças de condutividade eléctrica e de temperatura de que resultam diferentes taxas de migração entre amostras. Além disso, quanto maior essa variação menor é a altura do mesmo que se pode aproveitar para revelação (cf. parte V, secção A1).

3) Colocação das amostras

Procedimento

Cada extracto era transferido para o gel mediante a embebição dum

rectângulo de papel Whatman nº 1 com cerca de 1 cm × 0,3 cm, apenas até cerca de 2/3 do seu comprimento, para ser colocado na sua posição pré-definida ao longo duma fenda no gel [May 1991].

A preparação dessa fenda era feita da seguinte maneira (figura 3.3): colocava-se o vidro de suporte do gel sobre acumuladores de frio (para mantê-lo próximo dos 0 °C), e destapava-se parcialmente, dobrando sobre si mesma a película aderente na direcção perpendicular ao lado maior, até à posição onde iria cortar-se a fenda. A parte destapada é a que depois fica orientada para o cátodo, e é sempre menor que metade do comprimento (lado menor) do gel. Em seguida, passava-se um fio de pesca, esticado entre as duas mãos, de modo a separar-se o gel do vidro, até à distância desejada; depois, mantendo-o rigorosamente paralelo ao lado por onde foi introduzido, levantava-se a partir dum dos lados o fio de pesca, de modo a cortar uma fenda onde haviam de ser colocados os aplicadores de papel de filtro embebidos nos respectivos extractos. Deste modo, também se consegue o fácil deslizamento da parte que se vai orientar para o cátodo, de modo a permitir a inserção das amostras, dispondo-as na parede do gel virada do lado anódico para a fenda; no final da colocação dos aplicadores, deslizava-se de novo a parte livre do gel para fechar a fenda e permitir o estabelecimento da corrente através do gel (protocolo 3, Apêndice III-A). Pelo menos Micales *et al.* [1986] recomendam a separação do gel durante a aplicação das amostras.

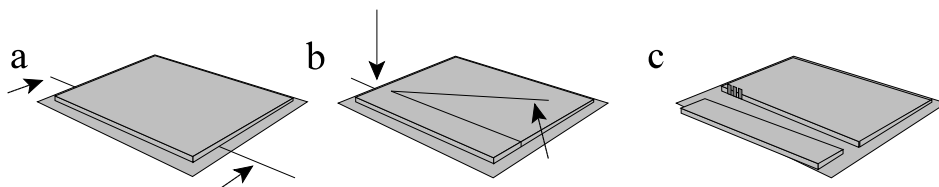


Figura 3.3 — Preparação do gel para a colocação das amostras. a) Passagem do fio de pesca (movimento das setas) entre o gel (cinzento) e o vidro. b) Fixando o fio de pesca num dos lados sobre o vidro (seta vertical), levanta-se a outra ponta de modo a abrir uma fenda no gel. c) Deslizando a parte proximal, podem colocar-se as amostras (rectângulos de papel de filtro embebidos nos respectivos extractos).

Considerações

Uma especial atenção era necessária:

- Ao tempo necessário a completar a transferência das amostras, podendo chegar a mais de 20 minutos por gel, assim exigindo manterem-se as amostras próximo dos 0 °C, tanto no gel (colocado sobre os acumuladores de frio) como nos tubos (imersos num banho de gelo, até à sua reposição no congelador a -20 °C mal se completavam as aplicações para um gel);
- À possibilidade de contaminação entre aplicadores adjacentes, até ao

início da electroforese, devido ao excesso de líquido — assim, houve o cuidado de retirar o excesso de líquido de cada aplicador antes de colocá-lo de encontro ao gel, mesmo assim deixando 1/3 da sua superfície seca para permitir a sua difusão no papel por capilaridade, só se fechando a fenda depois de todas as amostras terem completado essa difusão.

A distância entre o lado a orientar para o cátodo e a fenda depende do espaço que se pretende disponível para a migração de actividades enzimáticas no sentido do cátodo. Se a migração nesse sentido não é expectável, então há toda a vantagem em usufruir do máximo de volume de gel do outro lado (para o ânodo), até porque permite à frente do tampão migrando a partir do cátodo atingir mais cedo as amostras, facilitando uma maior definição das bandas nos zimogramas. A largura da porção menor é, nesses casos, a mínima necessária à colocação dos panos de celulose (cf. secção seguinte), isto é, 2,5–3 cm; caso contrário ela terá de ser maior, como foi o caso do presente estudo quando se preparava o gel C (nomeadamente as actividades PER e também MDH, cf. “Resultados” parte II, secções A-1 e 2), optando-se neste gel por deixar cerca de 6 cm de distância entre a fenda do gel e o lado do gel a virar para o cátodo.

Para facilitar a identificação das amostras introduzia-se, em regra de 10 em 10, um espaço; e para acompanhar o progresso da electroforese, incluía-se a seguir à 40^a uma amostra embebida em corante alimentar (Condi Alimentar S.A., Camarate) [May 1991]; além disso, especialmente na investigação de novas actividades enzimáticas (mas nem sempre nas análises de rotina), era frequente juntar uma amostra de sangue humano entre a 20^a e 21^a amostras (com espaços de separação). O sangue utilizado era de origem idónea e previamente verificado clinicamente, sendo útil por geralmente conter actividades enzimáticas que serviam de controlo positivo para cada revelação, além de que o processo de extracção envolvia uma solução muito mais simples (50 mM Tris pH 7,4 com 5 mM DTT e 25% etilenoglicol). A posição do corante alimentar desaparecia sempre no decurso da revelação enzimática, por isso a posição das actividades do sangue (e da hemoglobina) também era útil como padrão interno de migração dentro do gel.

Em regra cada gel continha metade de amostras identificadas como azinheira e a outra metade como sobreiro, intercaladas em grupos de 10 para otimizar a visualização de padrões discriminantes (10 Az – 10 Sb – 10 Az – 10 Sb, em que os traços representam os espaços de separação necessários a facilitar a visualização). No caso da presença de amostras

com híbridos e/ou seus descendentes (X), havia sempre amostras de sobreiro e azinheira que eram colocadas em paralelo, em grupos de 5, com mesmo intuito de facilitar a visualização de diferenças (5 Az | 5 Sb – 10 X – 10 X – 5 Az | 5 Sb).

B — Electroforese

1) Montagem do dispositivo de electroforese

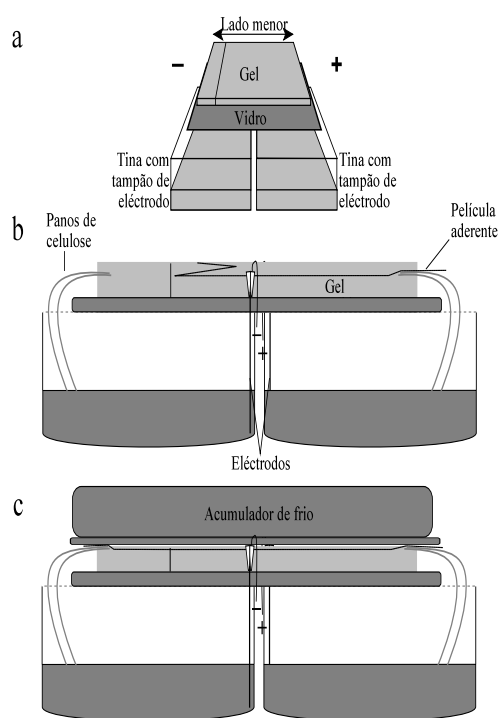


Figura 3.4 — Esquema da montagem do dispositivo de electroforese. a) Disposição do gel, sobre as tinas com os eléctrodos. b) Alçado da montagem do dispositivo, no momento em que se inicia o passo de transferência das amostras para o gel. Note-se que a película transparente se encontra parcialmente removida de modo a deixar os aplicadores das amostras livres. c) Alçado do dispositivo após a remoção dos aplicadores, com reposição da película aderente sobre toda a superfície do gel, e colocação do acumulador de frio intercalado por um vidro (início da fase de separação da electroforese).

O desenho do dispositivo de electroforese baseou-se nas descrições de May [1991], complementadas pelas de Kephart [1990] e de Micales *et al.* [1986]. Adaptaram-se recipientes de plástico para servirem de tinas para o tampão de eléctrodo, montando-lhes eléctrodos de aço inoxidável (Apêndice III-B). Cerca de 200 mL de tampão de eléctrodo eram colocados em cada tina e nele embebidos panos de celulose (Wypall Lite, Kimberley Clarke código 7461), dobrados em metade, 2 por eléctrodo. O vidro do gel era colocado sobre as tinas justapostas e um dos lados dos panos de celulose colocados sobre o gel para formarem uma ponte com o tampão banhando os eléctrodos (figura 3.4 a, b). Antes da aplicação da corrente verificava-se mais uma vez a possibilidade de alguma descontinuidade localizada entre os dois eléctrodos, nomeadamente alguma abertura da fenda ou falha de contacto com a ponte formada pelos panos de celulose.

Dava-se então início à fase de transferência das amostras para o gel, isto é, durante 10 a 15 minutos a corrente aplicada servia para promover

a migração inicial das actividades enzimáticas para dentro do gel. Após esta fase, retiravam-se os aplicadores, verificava-se de novo se haveria alguma descontinuidade entre os dois eléctrodos, estendia-se a película aderente de modo a recobrir todo o gel, e sobre este colocava-se uma placa de vidro e um acumulador de frio (o mesmo que serviu para refrigerar o gel durante a colocação dos aplicadores), para concluir a montagem do dispositivo para a fase de separação, isto é, a electroforese propriamente dita (figura 3.4 c).

2) Protocolos de separação de isoenzimas

O aquecimento do gel durante a electroforese limita a voltagem a utilizar e mesmo assim requer que todo o processo decorra a frio para controlar a temperatura [May 1991], o que se conseguiu com o acumulador de frio sobre o gel e mantendo o dispositivo de electroforese dentro de uma vitrine frigorífica a 4 °C. Por seu lado, o tempo necessário para a resolução dos isoenzimas é idealmente o mais curto possível, em primeiro lugar pela cinética de desnaturação de cada proteína e depois pela progressiva influência da difusão, com alargamento das bandas e redução da sua intensidade. Assim, a voltagem aplicada não poderia ser demasiado baixa. As electroforeses realizaram-se com voltagem constante, e o seu progresso monitorizado pela intensidade de corrente (amperagem) e migração do corante alimentar (cf. secção A3).

A duração da electroforese varia com os diferentes sistemas de separação, tendo-se determinado empiricamente tempos mínimos para assegurar a resolução das bandas. Só no caso do sistema R se conseguia em tempo útil uma migração da frente do tampão até quase ao fim do gel, mas isso não era forçosamente sinónimo de melhor resolução, especialmente se acompanhada de maior aquecimento.

Sistema "C"

Adaptado da fórmula de Clayton e Tetriak descrita por May [1991].

Tampão do eléctrodo: Ácido cítrico 50 mM, aproximadamente 1,15% (v/v) N-(3-aminopropil)-morpholine (Sigma A-9028) para dar pH 6,1; tampão do gel: tampão do eléctrodo 10 % (v/v) em água, pH 6,1.

Electroforese: 300 V, 3 horas. Corrente geralmente entre 90 e 100 mA.

Sistema "R"

Também conhecido como sistema de Ridgway et al.. Formulação segundo May [1991], adaptada.

Tampão do eléctrodo: Ácido bórico 0,3 M, hidróxido de lítio 60 mM

para dar pH 8,1; tampão do gel: tampão do eléctrodo 1 % (v/v) em Tris 30 mM, Ácido cítrico 3,7 mM, pH 8,5.

Electroforese: 300 V, 2 horas e 30 minutos. Corrente inicialmente a 50–60 mA, decrescendo até aos 28 mA perto do fim.

Sistema “H”

Adaptado da fórmula de Cheliak e Pitel descrita por Micales *et al.* [1986].

Tampão do eléctrodo: Tris 125 mM, ácido cítrico 40 mM para dar pH 7,0; tampão do gel: L-histidina 50 mM, EDTA 1,4 mM, HCl 4,5–5 mM pH 7,0.

Electroforese: 200 V, 2 horas e 15 minutos. Corrente inicialmente a 55–65 mA, decrescendo para cerca de 40 mA.

Sistema “9”

Fórmula de Selander *et al.* descrita por May [1991].

Tampão do eléctrodo: Tris 10 mM, ácido maleico (Sigma M-0375) 0,1 M, EDTA 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaOH 0,12 M para dar pH 8,0; tampão do gel: tampão do eléctrodo 5 % (v/v) em água, pH 7 aproximadamente.

Electroforese: recomenda-se a voltagem de 200 V durante 2 horas e 30 minutos, com a amperagem a atingir mais de 120 mA, exigindo muita vigilância da refrigeração.

Sistema “4”

Fórmula de Selander *et al.* descrita por May [1991].

Tampão do eléctrodo: Tris 0,223 M, ácido cítrico 94 mM, NaOH 50 mM para dar pH 6,3; tampão do gel: Tris 8 mM, 3 mM ácido cítrico, 3 mM NaOH para dar pH 6,7.

Electroforese: geralmente a 200 V durante 3 horas, com a corrente inicialmente a 55–85 mA, aumentando ligeiramente durante a electroforese. Este sistema coloca alguns problemas de temperatura elevada no gel.

Sistema “M”

Fórmula de Market e Faulhaber descrita por May [1991].

Tampão do eléctrodo: Tris 0,18 M, ácido bórico 0,1 M, EDTA 4 mM, pH 8,7; tampão do gel: tampão do eléctrodo 25 % (v/v) em água, pH 8,7.

Electroforese: a única tentativa decorreu a 300 V durante 3 horas, com corrente a 35 mA.

Parte V: revelação de isoenzimas

A — Protocolos

1) Procedimento

No final da electroforese o gel era seccionado em 3 fatias com cerca de 1,6 mm [May 1991, Micales *et al.* 1986], cada uma para a respectiva revelação enzimática, na sequência de passos abaixo:

1. Colocava-se o vidro de suporte do gel sobre um pano de celulose húmido, para evitar deslizamentos, com o lado menor paralelo ao plano dos olhos;

2. Os cantos do lado esquerdo do gel (o do extremo catódico e o do extremo anódico) eram cortados para assegurar a correcta orientação dos zimogramas;

3. De cada um dos lados maiores do gel empilhavam-se réguas de fórmica com 1,6 mm de espessura (excepto o par inferior, com apenas 1 mm) e comprimento excedendo o lado maior do gel, tantas quantas necessário até chegarem logo abaixo da superfície do gel;

4. Usando fio de pesca esticado entre as duas mãos e apoiando nas duas pilhas de réguas, seccionava-se a fatia superior do gel atravessando-o horizontalmente;

5. Esta primeira fatia era rejeitada por ser de espessura irregular e não permitir boa resolução dos padrões de bandas, retirando-se em seguida o par de réguas superior, para nova secção;

6. A fatia obtida da secção seguinte era levantada do gel com o cuidado de evitar partir-se, e transferida para uma tina de revelação;

7. Retirava-se mais um par de réguas, seccionava-se uma nova fatia e transferia-se esta para outra tina de revelação, repetindo-se este conjunto de passos até chegar ao par de réguas inferior, assim não aproveitando a camada de gel adjacente ao vidro.

Geralmente, se não tiver desidratado e tiver espessura constante, um gel produzido a partir duma solução de amido de 300 mL produz 3 fatias que são réplicas entre si. Caso se verificasse que não era possível obter 3 fatias como esperado (passo 3 acima), podia optar-se por aproveitar o material junto ao vidro, aí sendo necessário utilizar uma régua de 1,6 mm na base da pilha, usando fio de pesca para no final separá-la do vidro. Mas a camada inferior geralmente tinha menos actividade enzimática que as outras, e quando se tinha de recorrer a ela, era para um enzima com

atividade mais intensa ou de informação menos crítica (peroxidases no sistema C, superóxido dismutase no sistema R, ou fosfogluconato desidrogenase no sistema H).

2) Soluções de revelação usadas nas análises de rotina

Cada fórmula apresentada é para a revelação de 2 fatias de 2 geis, isto é, 80 amostras. A lista completa dos reagentes e formulários utilizados encontra-se no Apêndice III-C. Excepto onde indicado, a referência completa para cada procedimento é a da revisão de May [1991].

Sistema "C"

Actividade enzimática: desidrogenase do malato EC 1.1.1.37 (MDH)

5 mL DL-malato a 0,5 M neutralizado com bicarbonato de sódio [May, 1991] + 10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 82 mL água + 1 mL de NAD a 20 mg/mL + 1 mL brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio a 10 mg/mL (MTT) + 1 mL metossulfato de fenazina a 2 mg/mL (PMS).

Incubação 2 horas à temperatura ambiente ou a 37 °C, protegida da luz. Diferenciação com mistura de 1 volume ácido acético (Merck 100063) + 4 volumes de água + 5 volumes de etanol (Merck 100983) (adiante designado por AAE) durante 15 minutos, para remoção de MTT não reduzido.

Actividade enzimática: diaforase EC 1.6.4.3 (DIA)

25 mg NADH + 2 mg diclorofenol-indofenol + 10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 89 mL água + 1 mL MTT.

Incubação 2 horas à temperatura ambiente ou a 37 °C, protegida da luz. Diferenciação com AAE para remoção de MTT não reduzido.

Actividade enzimática: peroxidases EC 1.11.1.7 (PER)

12 mL acetato 0,1 M pH 5,0 + 86 mL água + 2 mL H₂O₂ 3 % + 200 µL CaCl₂ 1 M + solução contendo 50 mg 3-amino 9-carbazol em 1,25 mL de N,N-dimetilformamida (Sigma D-4254).

Incubação 2 horas à temperatura ambiente ou a 37 °C. Diferenciação com glicerina (Riedel de Haën 33224) a 50%.

Sistema "R"

Actividade enzimática: esterases EC 3.1.1.– (EST)

100 mg Fast Blue BB + 90 mL água + 10 mL fosfato 1 M pH 6,0 [Soltis *et al.* 1983] + solução de substrato composta de 40 mg de α-acetato de naftil + 37 µL de α-butilato de naftil + 1 mL de acetona.

Incubação durante a noite à temperatura ambiente, protegida da luz.

Diferenciação com glicerina a 50%.

A utilização de β -acetato de naftil não revelava nada adicionalmente, enquanto com α -butirato de naftil [Bult & Kiang 1993] aumenta a consistência da revelação.

Actividade enzimática: isomerase de fosfoglucose EC 5.3.1.9 (PGI)

40 mg fructose 6-fosfato + 10 mL Tris 1 M pH 9,0 com 50 mM de MgCl_2 [Selander *et al.* 1986] + 88 mL água + 1 mL de NAD + 1 mL MTT + 1 mL PMS + 50 U desidrogenase de glucose 6-fosfato de *Leuconostoc mesenteroides* (G6PD).

Incubação pelo menos 1 hora a 37 °C, protegida da luz. Diferenciação com AAE para remoção de MTT não reduzido. O precipitado formado pelas PGI pode acumular-se a tal ponto que se torna difícil resolver as bandas formadas, por isso incubar sem vigilância depois da 1ª hora pode ser prejudicial. Além disso, esse precipitado tende a sair do gel para a solução à mínima agitação da tina, voltando a depositar-se nas proximidades da banda de origem e assim comprometendo ainda mais a resolução das bandas. Por isso, embora não fosse estritamente necessário para os objectivos do presente estudo, a dissolução em agarose (cf. as actividades do sistema H e secção “Notas”) impede esta difusão e permite no geral um muito superior controlo da revelação.

O tampão utilizado é o recomendado por Selander *et al.* [1986].

Actividade enzimática: dismutase do superóxido EC 1.15.1.1 (SOD)

20 mg “Nitro blue tetrazolium” + 1 mL Tris 1M pH 8,5 + 1 mL NAD + 3 mL PMS + 6 mL água + 10 mL solução de agarose a 1,6 % [Bult & Kiang 1993].

Incubação à temperatura ambiente e com luz solar incidente, até à manhã seguinte. Pode optar-se por omitir o NAD.

Sistema “H”

Actividade enzimática: redutase da glutathione EC 1.6.4.2 (GsR)

5 mg NADPH + 1 mg diclorofenol-indofenol + 1 mL Tris 1 M pH 8,5 + 8 mL água + 1 mL MTT + 50 mg glutathione oxidada (GSSG) + 10 mL solução de agarose a 1,6 % [Bult & Kiang 1993].

Incubação 2 horas a 37 °C, protegida da luz. Diferenciação com AAE para remoção de MTT não reduzido.

Actividade enzimática: fosfoglucomutase EC 5.4.2.2 (PGM)

100 mg glucose 1-fosfato (Sigma G-1259 [Spencer *et al.* 1964, May 1991]) + 1 mL Tris 1 M pH 8,5 + 7,5 mL água + 1 mL NAD + 0,5 mL MTT + 1 mL PMS + 60 U G6PD + 10 mL solução de agarose a 1,6 %

[Bult & Kiang 1993].

Incubação 2 horas a 37 °C, protegida da luz. Diferenciação com AAE para remoção de MTT não reduzido.

A redução da quantidade de MTT para metade não comprometeu a formação específica de formazano e dá uma cor de fundo mais clara, com melhor contraste.

Actividade enzimática: desidrogenase de fosfogluconato EC 1.1.1.44 (PGD)

8 mg NADP + 20 mg 6-fosfogluconato + 1 mL Tris 1 M pH 8,5 + 100 µL MgCl₂ 1 M + 7 mL água + 1 mL MTT + 1 mL PMS + 10 mL solução de agarose a 1,6 % [Bult & Kiang 1993].

Incubação 2 horas a 37 °C, protegida da luz. Diferenciação com AAE para remoção de MTT não reduzido.

Notas

A solução de agarose era preparada em água, com a dissolução feita em micro-ondas e adicionando ao restante da solução de revelação só depois da temperatura baixar aos 60 °C aproximadamente; 20 mL (volume final) era suficiente para 2 fatias de gel, desde que só se aproveitasse a área contendo os enzimas (fácil de demarcar se usando o corante alimentar), distribuindo-se sobre a face exposta rápida mas cuidadosamente de modo a cobrir cada fatia por completo.

O enzima acoplador utilizado (G6PD, desidrogenase de glucose 6-fosfato de *Leuconostoc mesenteroides*, Sigma G-8408) tem a propriedade de utilizar indiferentemente o NAD ou o NADP como co-substrato, o que é economicamente muito vantajoso [Soltis *et al.*, 1983].

Parte VI: registo e análise dos resultados

A — Observação dos zimogramas

Os zimogramas produzidos por compostos corados eram observados imediatamente após a diferenciação, sobre um transiluminador de luz branca, enquanto os de produtos fluorescentes eram monitorizados periodicamente (intervalos de 15 minutos após a primeira meia hora de incubação) sob luz ultravioleta de 315 nm.

Em todos os casos os geis eram orientados com o lado anódico para cima, e graças ao corte feito nos cantos do lado esquerdo (cf. parte V secção A1) era possível identificar os zimogramas com o posicionamento das amostras no passo de colocação dos aplicadores de papel de filtro (cf. parte IV secção A3). Em geral não era difícil identificar as sucessivas amostras, mas para o caso de haver dúvidas, nomeadamente quando havia várias amostras negativas em sucessão, comparava-se entre fatias replicadas para fixar a ordem de cada amostra no gel.

O registo dos resultados era feito para cada actividade enzimática segundo as codificações que lhe eram específicas (cf. “Resultados” parte II), frequentemente acompanhadas duma redução esquemática das bandas presentes, como se exemplifica na figura 3.5.

Estes registos eram, tão brevemente quanto possível, adicionados ao ficheiro Excel ANALISES.xls (incluído no CD anexo ao presente trabalho), onde cada folha corresponde a uma série de extracção, exceptuando os híbridos com uma folha à parte. Os registos nesta folha de cálculo eram verificados por uma segunda pessoa, confrontando-os com os registos no caderno de laboratório.

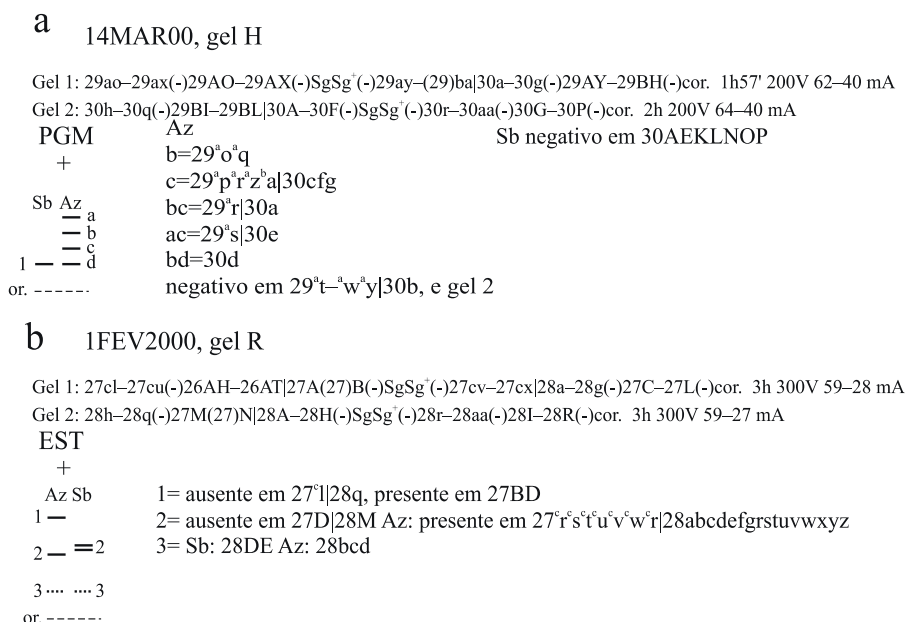


Figura 3.5 — Exemplos de registo de resultados no caderno de laboratório. As primeiras duas linhas são o registo das amostras colocadas em cada gel (Sg e Sg⁺ são amostras de sangue, cor. um corante alimentar) seguindo-se do lado esquerdo num esquema-resumo das posições relativas das bandas observadas e da origem (or.) da electroforese. a) PGM. b) EST.

Só quando finalizada a observação directa e registo se decidia se havia interesse em guardar a imagem do zimograma em fotografia, o que era feito após legendagem do gel com inscrições da data, do sistema de separação e da actividade enzimática (figura 3.6).

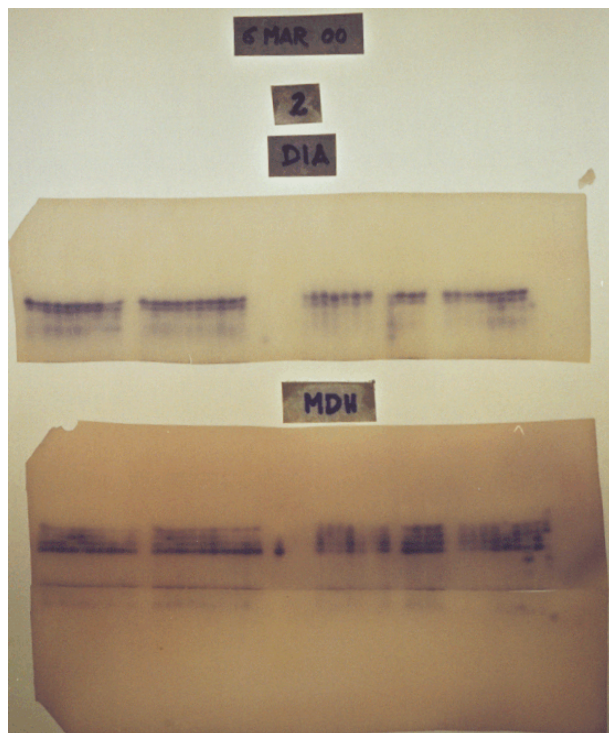


Figura 3.6 — Exemplo de registo fotográfico: electroforeses realizadas no dia 6 de Março de 2000, gel 2, DIA e MDH.

B — Estatística

O CD anexo ao presente trabalho contém todos os resultados de tratamento de dados realizados e o software de visualização (Columbus versão pessoal, distribuído com autorização expressa do fabricante Oasys, <http://www.oasys-software.com/products/dm/columbus/>).

1) Estimação

Distribuições de frequência

As distribuições de frequência obtiveram-se com base no ficheiro Quattro Pro zimogramas.qpw, adaptado a partir do ANALISES.xls, no qual todas as amostras (2430 no total, tendo-se incluído observações mais antigas que não figuravam no ANALISES.xls) foram ordenadas pelas séries respectivas. Esta folha de cálculo foi convertida numa tabela Paradox (zimogramas.db), à qual se adicionou um campo chamado “freq”, com valor 0 por defeito, para a apresentação dos resultados. A partir desta tabela, com programa Corel Paradox 9, definiram-se filtros e algoritmos de consulta (*queries*) no sentido de classificar as amostras segundo os mais diversos critérios, produzindo-se subtabelas (azinheiras.db, sobreiros.db, etc.) onde outros filtros e quesitos podiam ser aplicados. Destas distribuições de frequência podiam calcular-se as estimativas mais diversas.

Exemplos de ficheiros SQL utilizados nestas operações, com comentários sobre o seu conteúdo, encontram-se no Apêndice IV secção B.

Potencial de cada marcador isoenzimático

No presente estudo a descrição do potencial de cada marcador genético em termos de detecção de hibridismo ou introgressão é baseada em cálculos de especificidade e sensibilidade apenas para as actividades que foram incluídas em análises em larga escala. A probabilidade dum marcador produzir uma classificação incorrecta tanto pode constituir uma perda de especificidade como de sensibilidade, dependendo do ponto de vista com que se utiliza esse marcador. No presente estudo, usou-se na prática o ponto de vista da classificação de cada indivíduo como sendo diferente de sobreiro ou não. Assim, a presença dum zimograma de híbrido ou de azinheira é um “positivo”, e a sua ausência um “negativo”. Todos os indivíduos que sejam sobreiros e apresentem um tal zimograma são falsos positivos (e a sua proporção estima a perda de especificidade do

marcador em causa em relação aos 100%), e todos os que não sejam e não apresentem esse zimograma são falsos negativos (perda de sensibilidade).

Probabilidade de hibridismo

O cálculo das probabilidades de hibridismo nas parcelas mistas, tendo em conta que essas probabilidades eram presumivelmente baixas para não ser detectado nenhum híbrido de 1ª geração, usou-se o modelo de Poisson $P(r) = e^{-\mu} \mu^r / r!$, em que r é o número de ocorrências do evento para o qual se calcula a probabilidade e μ o número médio dessas ocorrências. Considerando $r = 0$ (não haver nenhuma ocorrência), e $\mu = NP$, sendo P o valor a determinar e N o número de indivíduos observados, $P(0) = e^{-NP}$, estimando-se P pela desigualdade $1 - e^{-NP} < \alpha$, tal que a probabilidade de haver 1 ou mais ocorrências é majorada por α . Obtém-se assim $P < -\log_e(1 - \alpha)/N$.

2) Testes de hipóteses

Tabelas de contingência

Para determinar se as parcelas mistas poderiam ser consideradas em conjunto, ou seja, se para cada espécie elas constituem uma só população, usou-se o método das tabelas de contingência para o número de alelos observados, em comparação com os esperados na hipótese de aplicarem-se as mesmas frequências a todas.

Na formulação do correspondente teste χ^2 , trata-se de comparar as frequências p_{ij} (alelos i , parcelas j) com as frequências $p_{i.}$ do conjunto das parcelas, tal que $(2N_j p_{ij} - 2N_j p_{i.})^2 / (2N_j p_{i.})$ para cada parcela, com N_j a representar a dimensão da amostragem (número de adultos) na parcela j . O número de graus de liberdade é dado pela diferença entre o número $n \times s$ de comparações (n alelos, s parcelas) e o número de parâmetros requeridos para estimar as frequências esperadas, $(n-1) + s$. Deste modo, obtém-se a fórmula

$$\chi^2_{(n-1)(s-1)} = 2 \sum_{j=1}^s N_j \sum_{i=1}^n \frac{(p_{ij} - p_{i.})^2}{p_{i.}}$$

Outra tabela de contingência foi construída para examinar se havia independência de associação, entre gâmetas portadores de alelos de sobreiro e de azinheira, isto é, entre as 4 combinações ♀ sobreiro $\times$ ♂ sobreiro, ♀ sobreiro $\times$ ♂ azinheira, ♀ azinheira $\times$ ♂ sobreiro, e ♀ azinheira $\times$ ♂ azinheira. Neste caso a estatística χ^2 tem apenas 1 grau de liberdade, sendo necessário aplicar a correcção de Yates (subtracção de

0,5 ao valor absoluto do desvio entre frequência observada e esperada).

Modelos populacionais

Usou-se o cálculo da estatística χ^2 para o teste à hipótese de que as frequências observadas se desviavam das esperadas devido ao acaso, para dois modelos: a 1ª Lei de Mendel, onde se prevê que os alelos num *locus* heterozigótico segreguem homogeneamente (isto é, $\frac{1}{2} + \frac{1}{2}$) pelos gametas, e a distribuição de Hardy-Weinberg, que a cada frequência dum genótipo homozigótico faz corresponder o quadrado da frequência do respectivo alelo, e à dum heterozigótico o dobro do produto entre as frequências dos dois alelos relevantes. No segundo modelo o número de graus de liberdade é igual ao número de comparações menos o número de frequências alélicas necessárias para calcular os valores do modelo enquanto no primeiro é 1. Nos casos com 1 grau de liberdade, aplicou-se a correcção de Yates descrita na secção precedente.

3) Estimadores genéticos

Para cada *locus* com n alelos de frequências x_i , $i = 1, \dots, n$, e na comparação entre as parcelas $k = 1, \dots, L$, os parâmetros estimados foram:

Identities genéticas de Nei e G_{ST}

Para cada par de populações A e B, obtêm-se identities genéticas $j_A = \sum_i (x_{iA})^2$, $j_B = \sum_i (x_{iB})^2$ e $j_{AB} = \sum_i (x_{iA}x_{iB})$, e a identidade intrapopulacional média $J_S = \sum_k (j_k)/L$, donde se tira $H_S = 1 - J_S$ (nota-se ainda que $(j_A)^{-1}$ é o número efectivo de alelos nesse *locus*, A_e , para a população A). Entre todos os pares de povoamentos k e k' calcula-se a diferenciação entre povoamentos $D_{ST} = (\sum D_{kk'})/(L)^2$, com $D_{kk'} = \frac{1}{2}(j_k + j_{k'}) - j_{kk'}$ (note-se que $D_{kk'} = D_{k'k}$, portanto cada valor numérico é representado 2 vezes no numerador de D_{ST}). Obtém-se assim o coeficiente de diversidade genética $G_{ST} = D_{ST}/(H_S + D_{ST})$ [Nei 1973, 1987, 1997].

Estatísticas de Gregorius e colaboradores

A partir da diversidade genética $v = [\sum_i (x_i)^2]^{-1}$, idêntica ao número efectivo de alelos A_e , obtém-se a diferenciação total no povoamento $\delta_T = N(1 - 1/v)/(N - 1)$, sendo N o número de indivíduos observados. Note-se o paralelismo entre δ_T para uma parcela e H_S para o conjunto de parcelas.

A diferenciação de cada povoamento j em relação aos restantes, $D_j = \frac{1}{2} \sum_i |x_{ij} - x_i|$, em que o segundo membro do módulo, x_i , é a média aritmética das frequências x_i nos restantes $L - 1$ povoamentos. A

estatística δ é a média dos L valores D_j , ponderada ou não pela dimensão de cada população, para servir de referência aos valores D_j [Hattermer 1991].

Estatísticas de Wright (modelo das ilhas)

O coeficiente de fixação $F_{IT} = 1 - H_o/H_e$, em que H_o é a frequência (relativa) observada de heterozigóticos no conjunto dos povoamentos e $H_e = 1 - \sum(x_i)^2$, também referente ao conjunto dos povoamentos [Wright 1969]. A relação $F = 1/(2N_e)$ para o cálculo de N_e (tamanho efectivo da população) aplica-se apenas numa situação de neutralidade. Adicionalmente, o valor de referência de F é 0 apenas se as distribuições de frequência nos gâmetas masculinos e femininos forem idênticas; caso haja diferenças Δx_i entre as frequências nos gâmetas masculinos e femininos, o valor de referência F_{esp} para F_{IT} é negativo e dependente do valor dessas diferenças (Apêndice II-C), pelo que a estimativa de N_e refere-se à diferença ΔF entre o valor observado de F_{IT} e o F_{esp} .

Coeficiente de fixação $F_{IS} = 1 - LH_o/\sum_k H_{ek}$, isto é, substituindo o H_e na fórmula de F_{IT} pela média aritmética dos H_e de cada povoamento k . Para que esta estatística seja credível, é necessário assumir um N_e constante para todos os povoamentos e L grande [Nei 1987, 1997].

$F_{ST} = (F_{IT} - F_{IS})/(1 - F_{IS})$ é a medida de diferenciação entre povoamentos, ou seja do efeito de Wahlund [Wright 1965, 1969]. A partir deste valor obtém-se, assumindo que esta diferenciação é evolutivamente neutral, $N_e m = (1 - F_{ST})/(4\alpha F_{ST})$, em que $\alpha = L^2/(L - 1)^2$ [Wright 1965, Slatkin 1995, Berg & Hamrick 1997].

4) Cálculos

Excepto onde indicado explicitamente, todos os cálculos foram realizados com o programa Corel Quattro Pro, versão 9, em plataforma Windows (32-bit). Cabe especial menção ao programa GENEPOP, versão 3.4, que permite realizar testes de hipóteses e estimações definindo os intervalos de confiança com base em cadeias de Markov [Raymond & Rousset 1995]. Os resultados do mesmo são apenas mencionados no texto onde seja relevante, e incluem-se os valores detalhados no CD anexo.