

Parte I: os carvalhos cerqueiros são híbridos

A — Importância dos marcadores genéticos no estudo dos híbridos

Pela publicação de parte do presente trabalho [Oliveira *et al.* 2003], fez-se a primeira demonstração genética do hibridismo dos carvalhos cerqueiros, à qual se seguiu mais recentemente a publicada sobre material italiano através das regiões ITS do rDNA [Bellarosa *et al.* 2005]. Anteriormente, o seu estatuto híbrido só se podia aferir por critérios morfológicos e geográficos, e que não deixavam margem para dúvidas: os seus caracteres morfológicos assemelham-se aos de azinheira ou de sobreiro ou, se diferentes dos destas duas espécies, são-lhes intermédios; e a sua ocorrência é tanto quanto se saiba dispersa, sempre na proximidade de sobreiro e azinheira.

Os marcadores isoenzimáticos utilizados no decurso do presente trabalho permitem que a aferição desse estatuto híbrido se faça também por critérios genéticos. Esta nova dimensão de análise só é válida se apoiada em amostragens, das duas espécies, que sejam suficientemente representativas para definir com segurança o grau de especificidade de cada marcador, o que à escala limitada do Alentejo foi encetado com o presente estudo; uma vez estabelecida essa definição, torna-se possível detectar híbridos em qualquer contexto — tarefa especialmente importante no rastreio de materiais de propagação, onde a morfologia dos híbridos parece não ser distintiva — e ir além dos híbridos para caracterizar as linhagens que deles descendem. Com os marcadores genéticos, em suma, abre-se o caminho à investigação de pelo menos duas questões ligadas às descendências dos híbridos:

i) A dinâmica de formação e manutenção de genótipos introgridos nas populações de sobreiro e de azinheira.

ii) A correspondência entre a qualidade da cortiça do sobreiro (e doutras características de interesse económico, tanto em sobreiro como em azinheira) e a presença de marcadores genéticos da outra espécie.

Em relação à segunda questão, também se inclui a possibilidade dum melhor esclarecimento dos sobreiros de estatuto duvidoso, como os de cortiça preguenta e os “negrais”.

Os estudos já existentes com marcadores de DNA citoplásmico, sobretudo o de Jiménez *et al.* [2004], sugerem que muitos dos indivíduos de cada uma das duas espécies — senão mesmo todos — têm algum grau de introgressão de genes da outra espécie, o que não surpreende tendo em conta a já longa presença das duas linhagens filogenéticas na Bacia do Mediterrâneo. Assim sendo, quanto maior a cobertura do genoma de cada espécie com marcadores genéticos, mais provável será encontrarem-se ambiguidades derivadas da presumível introgressão entre ambas, nomeadamente de azinheira em sobreiro. É por isso que, mais do que esta consideração teórica sobre a “pureza” de cada espécie, a definição de marcadores genéticos fiáveis deve ser valorizada pelo impacto económico que o hibridismo entre sobreiro e azinheira pode ter, e ambas as questões destacadas acima são fundamentais para a sua compreensão.

O caso da planta SM2

Apesar de ser indicada como híbrida e apresentando características atribuídas aos carvalhos cerqueiros, a planta SM2 poderia ser, na verdade, descendente dum híbrido — pelo menos assim indica o zimograma PGM semelhante a sobreiro, que não é contradito por nenhuma das descendentes dele obtidas que foram analisadas. Uma hipótese alternativa é a de tratar-se dum híbrido de primeira geração entre sobreiro e azinheira, mas cujo alelo de azinheira é o raro *Pgm*⁵ (a sua frequência esteve globalmente abaixo de 0,01, mas atingiu cerca de 0,025 nas plantas provenientes de Testa e no pólen em Alfaiates), que é indistinguível do de sobreiro.

Note-se que a primeira hipótese (descendente de híbridos) seria virtualmente irrefutável caso houvesse mais *loci* incaracterísticos dos híbridos. A incerteza sobre a classificação da planta SM2 põe em evidência dois aspectos da análise do hibridismo centrada em marcadores genéticos: por um lado, a possibilidade de distinguir entre híbridos de primeira geração e gerações deles descendentes, mesmo quando se assemelhem fenotipicamente; mas por outro, a necessidade de dispor de tantos marcadores diagnosticantes quantos seja possível para realizar essa distinção.

B — Comportamento genético dos marcadores de hibridismo

Tratando-se de marcadores genéticos, é de prever que a transmissão dos genes respectivos através dos gâmetas seja conforme as predições da

teoria genética, análise que foi realizada nas descendências dos híbridos.

Os marcadores DIA e GsR produziram nos híbridos zimogramas (“X”) que puderam ser interpretados como intermédios entre os de sobreiro e azinheira. Esses zimogramas apareceram também nas descendências dos híbridos, embora nestas também reaparecessem os que são típicos das duas espécies (“Sb” e “Az”), indicando tratar-se dum só *locus*: tendo em conta a identificação, feita com base no conjunto de marcadores diagnosticantes, da proveniência do grão de pólen que lhe deu origem, foi possível deduzir em cada descendente qual dos dois alelos proveio do gametófito feminino (isto é, do híbrido), tendo-se verificado para ambos os *loci* uma boa correspondência com as proporções esperadas de acordo com a lei da segregação dos alelos nos gâmetas ($\frac{1}{2}$ de gametófitos femininos com o alelo de sobreiro e $\frac{1}{2}$ com o de azinheira).

No caso dos marcadores MDH, é possível separar pelo menos a actividade que migra para o cátodo no sistema C (MDH–) das restantes (MDH+). Nos híbridos, o zimograma MDH– era composto por 2 bandas comigrando com os marcadores de sobreiro e azinheira, isto é, houve uma expressão codominante do que parecem ser alelos dum *locus* codificando uma actividade MDH. Tal como em DIA e GsR, as descendências dos híbridos apresentavam, para este marcador, ou o zimograma dos híbridos ou os de sobreiro ou de azinheira. Mas a dedução do que seriam os alelos presentes nos gametófitos femininos dos híbridos resultou num desvio em relação às proporções esperadas (significativamente mais de $\frac{1}{2}$ aparentemente portador do alelo de sobreiro), o que era esperado tendo em conta a menor consistência da actividade de azinheira, patente já na análise nesta espécie; assim, haverá uma proporção de zimogramas MDH– que fora visualizados como sendo “Sb”, sendo na realidade “X”.

O marcador anódico (MDH+) apresentou nos híbridos um zimograma que, pelo número e intensidade das bandas, foi interpretado como intermédio entre sobreiro e azinheira. Nas descendências dos híbridos, para além dos zimogramas de azinheira, sobreiro e híbridos, observaram-se novas distribuições de actividade que aparentemente resultam de genótipos recombinantes em mais dum *locus* que não foi possível analisar em detalhe. Apesar desta complexidade e de alguns problemas de interpretação a ela inerentes, a classificação simplificada de cada zimograma dentro de classes “Az”, “Sb” e “X” conduziu a um resultado global muito próximo da expectativa de segregação nos híbridos.

A expressão das actividades PGM não foi detectada na maior parte dos híbridos, e por si só não informa sobre a presumível extensão da

interpretação genética dada para as folhas de azinheira (um só *locus* polimórfico, enzima monomérico), isto é, nos híbridos encontrar-se-iam sempre o alelo de sobreiro e um dos alelos de azinheira, enquanto nas suas descendências apareceriam todas as combinações entre os alelos de azinheira e o de sobreiro, incluindo as das espécies parentais. A expectativa para as descendências confirmou-se, até permitindo determinar o genótipo de SM1 — e nesta pelo menos, a segregação dos alelos de sobreiro e azinheira nos gâmetas femininos dos híbridos correspondeu à proporção esperada de $\frac{1}{2}$ para cada.

As actividades PGI polimórficas deveriam apresentar-se, tanto nos híbridos como nas suas descendências, com um repertório de zimogramas ainda mais variado do que em sobreiro e mesmo em azinheira, mas a ausência de registos precisos sobre essa variabilidade (excepto em sobreiro) não permite verificar as expectativas com rigor. No entanto, a proporção aumentada de zimogramas + nessas descendências, bastante próxima dos valores teoricamente esperados (cf. nota de rodapé à secção D3 da III parte de “Resultados”) é concordante com a interpretação genética feita para as duas espécies.

Globalmente, pode concluir-se que os genes codificando actividades discriminantes entre sobreiro e azinheira são alélicos nos híbridos. Só nos casos de GDH (sementes) e PGD não se podem tirar conclusões porque os dados são insuficientes, e no de EST (sistema R) a expressão do marcador de azinheira (banda 1) no material híbrido também não foi interpretada, pelo desconhecimento da base genética das actividades observadas.

C — Outros *Quercus*

Outra perspectiva que se abre com o presente estudo é a adopção da mesma estratégia para a análise do hibridismo entre outros pares de espécies do género *Quercus*. Em geral obteve-se expressão consistente das actividades já reconhecidas em sobreiro, azinheira e seus híbridos, e algumas (principalmente DIA e MDH+) sugerem a possibilidade de discriminação interspecífica. Embora a amostragem apresentada na figura 4.18 tenha reduzida relevância para o panorama de hibridismo de espécies ibéricas sumariado na figura 2.3, é possível que uma investigação sistemática dirigida à validação de marcadores de hibridismo nessas espécies confirme este potencial.

Parte II: Baixa probabilidade de formação de híbridos

A — Resultados positivos

1) Os híbridos

Os carvalhos cerqueiros são bem conhecidos das gentes do Alentejo, e todos os que são referenciados no presente trabalho foram indicados por técnicos, guardas ou particulares. Dos 9 caracterizados com marcadores isoenzimáticos, todos apresentaram fenótipos híbridos, e somente SM2 talvez não seja híbrido de primeira geração mas sim descendente de híbrido (de SM1?, cf. parte I secção A). Ocorrem todos na proximidade de sobreiros e azinheiras, mas a sua distribuição geográfica parece preferencial para certos locais (figura 5.1): só em S. Marcos da Abóbada/Outeiro foram encontrados quatro (cf. Apêndice I, secção A2), e os híbridos CAB, VR e ALC distam poucos quilómetros entre si. Se se acrescentar a localização do presumível híbrido de Testos (cf. Apêndices I, secção A2, e II, secção D) e dos referenciados próximo do VR e na extrema da propriedade de Feijoas do Ramos, observa-se uma distribuição geográfica que, apesar dos poucos indivíduos, parece encontrar-se nos limites da zona ecológica submediterrânea (número 20 da Carta Ecológica [Albuquerque 1982]) nos casos a Norte de Évora, mas mais dentro da influência iberomediterrânea (zonas 21 e 22) nos restantes (figura 5.1).

Tendo em conta as características ecológicas (fito-edafoclimáticas) da localização dos povoamentos mistos estudados, pode considerar-se que estes são representativos, sob este critério, dos locais onde se encontraram híbridos (figura 5.1).

Conhecem-se numerosos pontos de contacto entre azinheira e sobreiro noutras regiões da Bacia Mediterrânea, como por exemplo no Alto Atlas [Belahbib et al. 2001], na Argélia e Sardenha [Sbay 2001] e por quase toda a Espanha suberícola [Jiménez & Gil 2001]. A inventariação de cerqueiros em todas as áreas de contacto entre as duas espécies que lhes dão origem poderia ter importância para definir factores ecológicos de risco da sua formação.

2) Presumíveis descendentes de híbridos

Houve poucos casos evidenciando a existência de linhagens derivadas

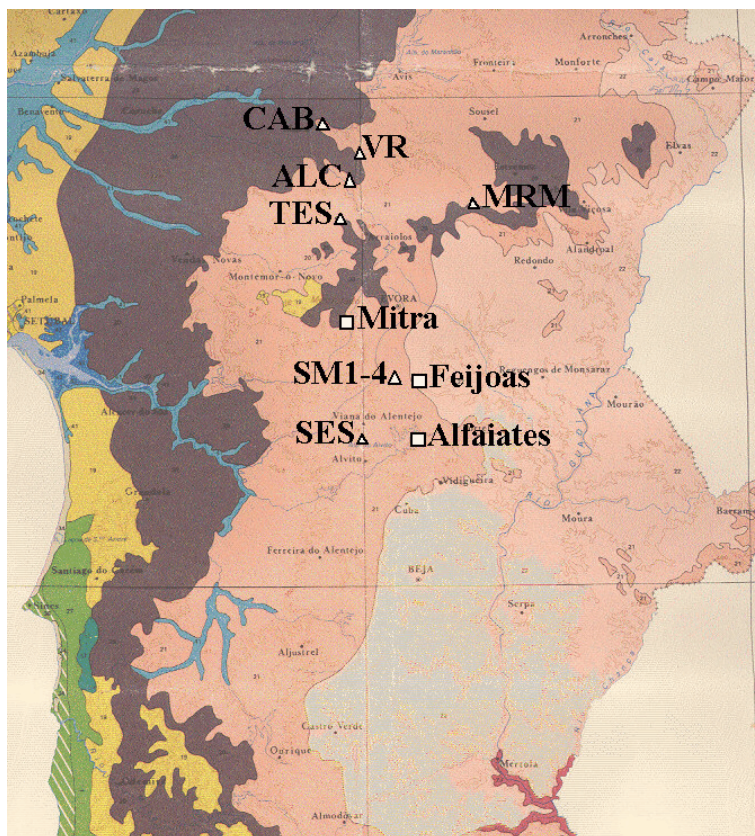


Figura 5.1 — Distribuição aproximada dos povoamentos mistos (quadrados) e dos híbridos (triângulos) sobre a carta ecológica [Albuquerque 1982]. As zonas ecológicas submediterrânea (número 20 nesta carta), iberomediterrânea (22) e mista (21) são, respectivamente, as de cor castanho-escuro, rosa claro e rosa-carne.

dos híbridos, isto é, de indivíduos (sementes, plantas de viveiro ou adultos) cujos zimogramas sugerissem introgressão dum alelo de azinheira em genótipos de sobreiro (ou vice-versa).

A nível de adultos poderia citar-se o zimograma PGM “bd” na árvore 30 de Feijoas (azinheira), mas que, face à constatação de que a banda de PGM pode ser o produto dum alelo raro presente em azinheiras, deve ser considerado normal (cf. “Resultados”, parte III, secção C1); de resto, registam-se o DIA “X” nas árvores 11 e 36 de Alfaiates (azinheiras) e alguns sobreiros de cortiça preguenta com DIA “X” ou “Az” em Montinho.

Em plantas jovens, depois de descontados os casos em que parece terem havido erros de avaliação de EST, contam-se apenas 2 azinheiras com PGM “d” (amostras 38c e 38i), algumas descendentes de A11 e A36 com o DIA “X” das respectivas mães, 2 sobreiros de Santiago do Cacém com DIA “X” (amostra 30AB) e “Az” (20K, que adicionalmente apresentava ACP-F intermédio entre sobreiro e azinheira), e 1 azinheira de Santiago do Cacém com zimogramas característicos duma ou outra das

duas espécies, e também dos híbridos (amostra 15U).

As amostras 38c e 38i poderiam ser homozigóticos para o alelo de azinheira que codifica a banda PGM “d”, mas a improbabilidade desse genótipo (além de ser contraditório com o da presumível mãe, M19, expressando “ac”) é pouco aceitável no quadro da variação que se possa considerar normal em azinheira. É possível que de facto haja nestes dois casos um alelo de sobreiro introgressado, transmitido através do pólen, enquanto a actividade de azinheira (possivelmente a ou c, considerando o fenótipo da presumível mãe) não teria sido revelada.

Os casos de aparente introgressão em plântulas de sobreiro, tal como os dalguns sobreiros adultos de cortiça preguenta, são todos relativos ao zimograma DIA, que ou é “X” ou “Az”. O facto de coincidirem no *locus* de DIA pode sugerir o mesmo que para a banda d de PGM em azinheira, isto é, a possibilidade de existir em sobreiro um polipéptido de DIA variante, raro, que tem as mesmas propriedades na electroforese que o de azinheira; nesse caso, tratar-se-ia duma variação intraspecífica natural nesse *locus*, que ocorreria esporadicamente. Assim, a interpretação das ocorrências em Montinho é incerta: pode tratar-se dum local onde há indivíduos com o alelo supostamente de sobreiro, variante, e assim ser uma coincidência isso acontecer onde há sobreiros de cortiça preguenta; ou pode tratar-se duma verdadeira introgressão de genes de azinheira. Contudo, o facto de PER apresentar a banda 1 em proporção demasiado elevada para a espécie, nestes sobreiros e nos de Chaminé, já constitui um segundo indicador, aparentemente independente, de que esses sobreiros não são “puros”.

A observação de 2 zimogramas DIA “X” em sementes descendentes de A11, em contraste com a sua aparente ausência nas descendentes de híbridos, sugere que se trata de genótipos diferentes. Assim, coloca-se o mesmo problema que na interpretação dos zimogramas DIA “X” e “Az” em sobreiro: se se trata duma variante natural em azinheiras, ou da introgressão de genes de sobreiro.

Em suma, nenhum dos casos estudados, à parte talvez a amostra 15U, é um exemplo inequívoco de introgressão. Mas o contraste entre a sua frequência em árvores atípicas (sobreiros de cortiça preguenta) e a raridade nos povoamentos de referência e mistos, que se consideram representativos com base na sua composição e localização geográfica, favorece a hipótese de introgressão naquelas.

A raridade de exemplos de presumível introgressão nos povoamentos mistos e de referência pode ser explicada de duas formas, que não se

excluem mutuamente:

i) o número insuficiente de marcadores de introgressão, pois teria de ser muito mais elevado (e distribuído uniformemente pelo genoma de sobreiro) para permitir uma sensibilidade adequada, o que parece estar fora do alcance de quem trabalhe apenas com marcadores isoenzimáticos — embora os mesmos não sejam de descartar em complementaridade com marcadores de DNA;

ii) tendência para as linhagens descendentes dos híbridos reaproximarem-se do padrão de cada espécie, o que pode ou não envolver selecção disruptiva do património híbrido. A reduzida proporção de descendentes de A11 e A36 com DIA “X” aponta nesse sentido, mas pode não tratar-se dum alelo de sobreiro; na realidade, as descendências de SES, SM1 e SM2 apresentam zimogramas de híbrido muito próximos dos esperados 50% por marcador, não dando por isso qualquer evidência de selecção disruptiva. E como a maior parte dos descendentes dos híbridos são retrocruzados, têm uma percentagem maioritária de genoma de sobreiro ou de azinheira, o que provavelmente lhes confere uma preferência por continuarem a retrocruzar-se no mesmo sentido (caso do SM2, cf. secção seguinte) e por isso as linhagens derivadas dos híbridos tenderão a reaproximar-se dos genótipos característicos de sobreiro ou de azinheira¹.

3) Biologia da reprodução dos híbridos

Embora com alguma incerteza quanto à correcta identificação dos diversos zimogramas nos descendentes dos híbridos, o que poderá ter influenciado um pouco as distribuições na tabela 4.18, parece inequívoco que os cerqueiros têm capacidade de produzir descendência a partir de pólen de azinheira como de sobreiro, além duma percentagem apreciável de pólen recombinante, provavelmente de autopolinização. Assim, o surgimento de linhagens divergentes dos híbridos por retrocruzamento com as espécies que lhes deram origem pode processar-se nos dois sentidos opostos, isto é, aproximando de azinheira como de sobreiro.

As percentagens de pólen de sobreiro obtidas para SES, SM1 e SM2, a partir das plântulas deles descendentes da frutificação de 1998, foram bastante diferentes. No caso de SM2, poderá considerar-se que a alta preferência por pólen de sobreiro (83%) seja uma confirmação adicional

¹ Fazendo uma simulação até 5 gerações depois do híbrido inicial (Apêndice II secção D), verifica-se que a proporção teórica de “sobreiros” e “azinheiras” sobe rapidamente para cerca de 80% de todos os indivíduos.

de que se trata dum descendente de híbrido por retrocruzamento com sobreiro, isto é, o facto de já ter uma componente predominante de sobreiro, resultante desse presumível retrocruzamento, confere-lhe uma maior tendência para ser fertilizado por pólen desta espécie (mas sem excluir outros tipos de pólen). No caso de SES, nenhuma das poucas plântulas de 1998 terá derivado de pólen de azinheira, mas a análise em sementes do ano 2000 indica que não é incompatível com esta espécie. Apenas em SM1 houve em 1998 uma igual probabilidade de ser fertilizada por pólen de sobreiro e de azinheira.

Estes resultados são ainda preliminares. Uma caracterização mais completa, incluindo uma amostragem de mais híbridos e maior número de descendentes por cada árvore, e levando mais em conta algumas dificuldades de interpretação dos zimogramas destas descendências (por exemplo resolvendo a hereditariedade dos marcadores MDH+), é necessária para tentar estabelecer um padrão mais consistente do comportamento reprodutor dos híbridos.

Com a observação de que cerca de metade das descendentes de híbridos e pólen de azinheira recuperam caracteres das folhas da azinheira, pode ir-se ao ponto de tratar-se de apenas 1 *locus* para este fenótipo aparentemente "complexo", em que o alelo da azinheira é recessivo. A implicação é que, se se julgar uma azinheira apenas com base no aspecto das folhas, é possível que esse indivíduo possua 25% de genes de sobreiro na F₂, ou até mais. Por extensão, outros caracteres em que o alelo recessivo seja o de sobreiro podem levar a considerar-se "sobreiros" indivíduos com uma elevada proporção de genes de azinheira (cf. figura 6.3, Apêndice II secção D). Se isso for verdade, então os eventos de hibridismo de há poucas gerações podem ser detectáveis com o pouco número de marcadores disponível, designadamente no que se trata de verificar nos sobreiros de cortiça preguenta ou os "negrais". O que não exime da necessidade de caracterizar outros marcadores discriminantes.

B — Resultados negativos

1) Majorante da probabilidade de incidência de híbridos nos povoamentos mistos

Apesar do número bastante elevado de plantas provenientes dos povoamentos mistos analisadas, nenhuma apresentou as características dos híbridos, sendo todas concordantes com a espécie a que pertencia a árvore donde foram retiradas, aparte alguns casos de contaminação entre

espécies que globalmente não chegaram a 1% (tabela 4.11). Este resultado negativo levaria a crer que não ocorreram híbridos nestas parcelas, mas é mais correcto majorar a probabilidade real com um valor P cujas estimativas se resumem na tabela 4.13.

Mesmo com o critério de risco menos rigoroso ($\alpha = 20\%$), o valor de P é inferior a 0,02% ou, se se admitir que a formação de híbridos é principalmente através da fertilização das azinheiras com pólen de sobreiro, este majorante pode subir até 0,043%. São valores suficientemente baixos para afirmar-se que é uma ocorrência rara. Como nos sistemas de regeneração natural há que levar em conta todos os processos de eliminação a que estas plantas (híbridas ou não) estão sujeitas, nomeadamente por acção de herbívoros ou por desmoitas, e também o impacto da selecção natural (competição por recursos, por exemplo), uma percentagem tão baixa implica que a ocorrência de um híbrido fértil nos povoamentos deverá ser muito esporádica. Se adicionalmente considerar-se a possibilidade de algumas desmoitas serem selectivas contra os híbridos, reduz-se ainda mais a possibilidade de ocorrerem espontaneamente².

Isto entra em forte contradição com os estudos de polinização controlada que davam a entender uma elevada percentagem de híbridos [Boavida et al. 2001], mas cuja relevância, como se destacou anteriormente (“Revisão bibliográfica” parte II, secções C3 e D2), é relativa. E torna-se perfeitamente claro que outros resultados indicando taxas muito mais elevadas de hibridismo ou introgressão [Ellena-Rossellò et al. 1992, 1997, Toumi & Lumaret 1998] não são generalizáveis. Sendo um facto que os carvalhos cerqueiros resultam deste hibridismo (parte I), a sua ocorrência em Portugal contrasta com a grande extensão de contacto entre as duas espécies.

Como a totalidade das amostras de referência que serviram para definir o padrão “puro” de cada espécie eram plantas de viveiro, e os híbridos estudados tinham todos porte arbóreo, poderia colocar-se a hipótese da expressão dos marcadores de hibridismo ser diferente nas plântulas em relação aos adultos, e assim a aparente ausência de híbridos, na amostragem feita, mascarar uma ocorrência real mais elevada. Mas o aparecimento de padrões híbridos nas descendências dos cerqueiros (nomeadamente nas folhas de plantas jovens), assim como a total

² A eliminação das descendentes de cada árvore, nomeadamente pelos consumidores de sementes e de folhas, é aliás a provável explicação para o facto de cada híbrido geralmente não originar uma mancha de descendentes introgrididos.

concordância da quase totalidade dos adultos dos povoamentos mistos com o padrão da respectiva espécie (à excepção de A11 e A36, cf. secção A), permite descartar tal hipótese — já em sementes, a ausência de zimogramas DIA “X” (e da banda 1 de PER), além do facto de GsR e PGM não poderem ser interpretados, constituem ainda uma forte limitação ao uso deste material no estudo do hibridismo.

Mas há que lembrar o facto da amostragem não ser muito representativa, e a vários níveis. Dentro de cada povoamento, apenas cerca de metade das descendências potenciais estavam representadas (tabela 3.1), o que em parte talvez fosse minorado se tivessem sido feitas várias colheitas de semente durante a época de frutificação, se se tivesse limitado o pastoreio nas parcelas, etc.; e houve famílias que o estiveram pouco, sendo relativamente fácil dentro de cada uma haver ocorrências de hibridismo não-detectadas (Apêndice IV secção A; mas cf. secção C1, para as azinheiras tardias); finalmente, há a possibilidade das árvores marcadas nos povoamentos mistos não serem susceptíveis de hibridar, em contraste com outras, destes ou doutros povoamentos. Em rigor, as estimativas de probabilidade aqui feitas aplicam-se apenas em materiais propagados em viveiro, nesse ano de frutificação (o contraponto com outros anos é analisado na secção C1) e, com limitações, nesses povoamentos. São, por isso, uma indicação inicial, mas que é suficientemente expressiva face aos pressupostos longamente reiterados de elevados riscos de hibridismo resultantes do contacto entre as duas espécies.

2) Implicações do valor obtido

Independentemente do valor real que alguma vez venha a ser obtido em cada povoamento misto, é do maior interesse examinarem-se as implicações da afirmação, qualitativa, de que este hibridismo é esporádico.

Aproveitamento para reprodução da semente de sobreiro proveniente de povoamentos mistos

A baixa probabilidade de formação de híbridos tornaria irrelevante a “boa prática” de rejeitar, para fins de propagação, as sementes de sobreiro provenientes de povoamentos mistos. Porém, na situação presente seria importante estudar mais extensivamente os materiais com essa proveniência, nomeadamente pela criação dum serviço de controlo da ocorrência de novos híbridos baseado nos marcadores desenvolvidos no presente trabalho (cf. secção D1). Esse mesmo serviço poderia até ser um meio de validar lotes de sementes para propagação provenientes de povoamentos mistos actualmente interditados pela actual legislação

(decreto-lei 205/2003, anexo IX, parte A), o que num prazo relativamente curto se justificaria pela inexistência de argumentos objectivos para as restrições impostas e, ainda menos, para os limites fixados.

A adopção de medidas restritivas à utilização de semente para reprodução pode implicar enviesamentos muito perigosos do património genético de sobreiro que se vai propagando. Não só os povoamentos mistos abrangem uma área importante da distribuição do sobreiro em Portugal, como essa área corresponde a condições fito-edafoclimáticas que parecem ser especialmente propícias à produção da cortiça de melhor qualidade em sistema de montado. A prioridade a observar quanto à elegibilidade da semente de sobreiro de qualidade para reprodução, é a de haver um número suficiente de árvores reprodutoras por povoamento [Varela 1995], e que essa legislação não satisfaz apesar das intenções expressas no respectivo anexo III.

Em suma, deviam flexibilizar-se os critérios, incentivando os proprietários dos povoamentos mistos produtores de cortiça de boa qualidade, e com um número elevado de árvores, a candidatarem as sementes respectivas à qualificação como materiais de reprodução, na condição de os sujeitarem a um controlo sobre a ocorrência de híbridos.

Delineamento das amostragens para a detecção de hibridismo

Considerando à partida uma probabilidade muito baixa de ocorrência de híbridos, mesmo nas árvores que mais provavelmente estariam expostas ao pólen heterospecífico como era a hipótese inicial do presente trabalho, a etiquetagem família a família torna-se uma sobrecarga desnecessária. A primeira abordagem à detecção de híbridos formados em cada ano deve antes fazer-se por rastreios em larga escala, como por exemplo na realização de amostragens da produção dos viveiros ou de povoamentos onde se suspeite haver um maior risco de hibridismo (cf. secção D1); em complemento, por exemplo se se identificasse alguma proveniência com incidência apreciável de híbridos, ou árvores *a priori* mais propensas a hibridar por terem na sua proximidade apenas indivíduos da outra espécie, então justificavam-se estudos a nível familiar, necessariamente em larga escala, cujo interesse pode até transcender a temática do hibridismo (cf. secção C e parte III).

A ocorrência daquilo que os produtores do Alto Alentejo designam por “negrais” (a não confundir-se com a mesma designação para *Quercus pyrenaica*) não é de todo compatível com a estimativa feita. Segundo certos relatos, existem propriedades onde esta forma aparece na

regeneração espontânea com bastante frequência (anualmente?) e em quantidade, propriedades essas que podem até não ter azinheiras na proximidade. Os negrais são sistematicamente desmoitados porque os produtores presumem tratar-se de híbridos. No decurso do presente trabalho não houve ocasião de analisar estas formas, mas é altamente desejável que essa análise se faça no futuro, com os marcadores genéticos disponíveis, de modo a tentar esclarecer o estatuto botânico destas plantas.

C — Factores que influenciam a probabilidade observada

Os valores de probabilidade de formação de híbridos são a resultante duma série de factores, limitadores ou facilitadores, que se passam a analisar no contexto do presente estudo e dos valores obtidos. Infelizmente, fora do projecto PAMAF 8153 que englobou o presente estudo, a informação relevante para esta análise é escassa, deixando muitas incógnitas por resolver.

1) Época da floração

Está largamente documentada a separação temporal entre as épocas de floração de sobreiro e azinheira, em que esta é a espécie mais precoce [Vasconcelos & Franco 1954, Varela 1995, Brandão 1996]. No entanto, a caracterização fenológica da floração em povoamentos marcados, como a que fez parte do projecto PAMAF 8153 (supervisionada pela Eng^a Maria Carolina Varela, da Estação Florestal Nacional), revela uma tal margem de variação intraspecífica, tanto em sobreiro como azinheira, que a simultaneidade das fases de polinização e receptividade de azinheiras tardias e sobreiros precoces é possível. Nomeadamente, observou-se no povoamento da Mitra, na Primavera de 1998 (de que resultou a frutificação do mesmo ano analisada no presente estudo), um período de pelo menos 14 dias em que 10 sobreiros (M01, M09, M14, M27, M32, M35, M40, M45, M47 e M50) produziam pólen em simultâneo com pelo menos duas de 5 azinheiras (M12, M48, M55, M60 e M64) [Brás 1999, Varela et al. em preparação].

O protandriso destas duas espécies, embora não muito pronunciado [Vásquez 1998, Boavida et al. 2001], implica pelo menos em teoria que o período em que haveria oportunidade de polinização de azinheiras por sobreiro estender-se-ia para além dos referidos 14 dias — as 5 azinheiras mais tardias (e mesmo outras menos tardias) terão estado receptivas a

pólen até doutros sobreiros menos precoces; esse mesmo protandrismo reduziria a possibilidade de polinização interspecífica no sentido inverso, mas durante esses 14 dias é provável que alguns dos sobreiros mais precoces também teriam estado receptivos quando ainda havia emissão de pólen de azinheira. Evidentemente, a situação torna-se ainda mais complicada tendo em conta que o pólen pode ter uma viabilidade prolongada (cf. “Revisão bibliográfica” parte II secção A2), e embora seja de admitir que o que está presente nas nuvens polínicas a cada momento é principalmente o libertado mais recentemente [Brandão 1996], a sua deposição na vizinhança dos estigmas antes destes estarem receptivos aumenta a probabilidade de polinização cruzada entre indivíduos com datas de floração menos próximas.

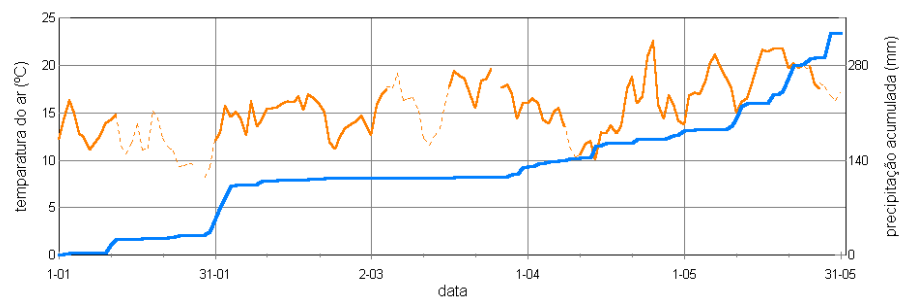
Os registos na Primavera de 2000 [Varela et al. em preparação], desta vez alargados às 3 parcelas mistas mas truncados (não houve possibilidade de acompanhar as florações depois de 5 de Abril, deste modo perdendo-se quase toda a informação sobre sobreiro), vieram revelar dois novos factos importantes: primeiro, que o comportamento de cada espécie era semelhante entre estes povoamentos, em termos de datas dos períodos de floração; segundo, que as datas em sobreiro foram de tal maneira adiadas, em relação às de azinheira, que a possibilidade de polinização interspecífica, mesmo de azinheira com pólen de sobreiro, pareceria quase nula: quase todas as azinheiras tinham terminado a sua fase de emissão de pólen (Fm₂) em 5 de Abril, aproximadamente como em 1998, mas nessa altura apenas um sobreiro de Alfaiates atingira a fase E, e a maior parte nas 3 parcelas ainda não tinha floração para além da fase C, quando em 1998 os mais precoces da Mitra já se encontravam em Fm₂ nessa data e, por isso, emitindo pólen quando havia azinheiras receptivas.

O paralelismo entre povoamentos em 2000 permite assumir-se que as datas de floração de 1998 em Feijoas e Alfaiates tiveram a mesma margem de variação que a registada na Mitra nesse ano; a ser assim, a frutificação de 1998 (representada nas plântulas caracterizadas para marcadores enzimáticos) teria sido das de maior oportunidade para o aparecimento de híbridos. Acrescente-se que o mesmo raciocínio se pode aplicar às nuvens polínicas de origem remota, uma componente importante da reprodução em *Quercus*: teria havido em 1998 um período onde conteriam uma elevada proporção de pólen heterospecífico.

Se considerarmos apenas as árvores cuja floração se deu durante os 14 dias de coexistência de pólen das duas espécies em 1998, obtiveram-se 137 descendentes de 4 azinheiras e 2 sobreiros, o que dá um valor de P

(majorante da probabilidade de ocorrência de híbridos nas descendências, cf. secção B) de 0,2% com $\alpha = 20\%$, ou de 0,3% para as 89 descendentes de azinheiras. Mas deve notar-se que a maior parte dos sobreiros elegíveis para esta análise não produziram semente nesse ano — ou tê-lo-iam feito em data diferente da da colheita. Entretanto, se incluirmos as azinheiras de Feijoas e Alfaiates que correspondessem à classificação de tardias em 1998, a amostragem real deste grupo terá sido maior. Em 2000, as únicas azinheiras do povoamento da Mitra que em 5 de Abril ainda não tinham atingido a fase de ântese eram precisamente as mesmas 5 consideradas tardias em 1998, uma evidência de repetibilidade que já era conhecida em sobreiro [M. C. Varela, comunicação pessoal]; as azinheiras números 4 de Feijoas e 17 e 22 de Alfaiates foram igualmente tardias em 2000, e assumindo que também o teriam sido em 1998 então podem acrescentar-se as 10 descendentes de F04 (não se obtiveram descendentes de A17 ou de A22), o que reduz P para 0,2% com $\alpha = 20\%$.

a)



b)

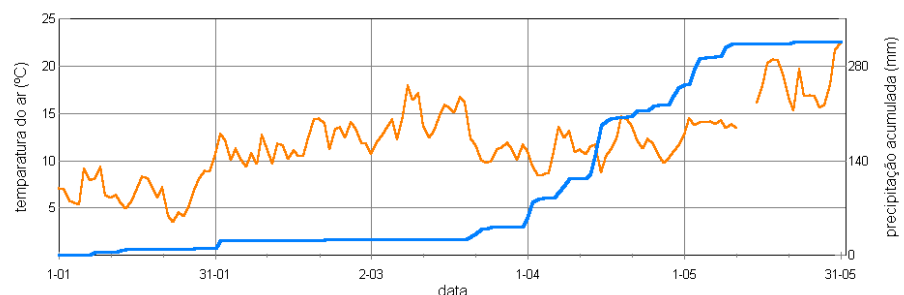


Figura 5.2 — Registos da média diária da temperatura do ar (linha laranja) e da precipitação acumulada (linha azul) relevantes para o povoamento da Mitra. a) Ano de 1998. Os registos na estação meteorológica da Mitra são incompletos, tendo as lacunas sido extrapoladas a partir dos valores de Reguengos, no caso das temperaturas somando a média das diferenças diárias (2,7 °C) entre as duas estações nesse ano (troços a tracejado), e no caso da precipitação usando directamente os valores de Reguengos, que noutros anos foram muito semelhantes aos da Mitra. b) Ano de 2000.

As variações nalguns parâmetros climáticos, de ano para ano, poderiam ser uma causa para as diferenças observadas entre estes dois anos. Os registos do Centro Geofísico de Évora (<http://www.cge.uevora.pt>) permitem analisar estes parâmetros (figura 5.2).

Das diferenças observáveis, parecem de especial relevância, em 1998, as temperaturas do ar relativamente altas nos dois primeiros meses, e em 2000 a reduzida precipitação até ao final do Inverno (acumulação de apenas 23 mm até 19 de Março). É plausível que essas temperaturas de 1998, acompanhadas duma acumulação precoce de precipitação na ordem dos 110 mm, tivessem facilitado uma antecipação da floração de sobreiro nesse ano — ou a falta de água até final do Inverno de 2000 (e as temperaturas frias de Janeiro) a tivessem retardado. A comprovar-se uma dependência das datas dos períodos de fertilidade de factores climáticos, que no caprichoso clima do Alentejo poderia manifestar-se tanto nas azinheiras [Brandão 1996] como nos sobreiros [Brás 1999, M. C. Varela et al. em preparação], então é previsível que no decurso da longa vida fértil de cada árvore a oportunidade de polinização interspecífica varie muito de ano para ano.

2) Barreiras reprodutoras após a polinização

Uma vez aceite que existe a possibilidade dum estigma receptivo de azinheira receber grãos de pólen viáveis de sobreiro (e não excluindo a combinação recíproca), até que ponto irá ou não resultar em fertilização, e depois no desenvolvimento e maturação da semente? Sabendo que a maior parte dos gametófitos masculinos é eliminada antes da conjugação, esta questão pode reformular-se da seguinte maneira: até que ponto essa eliminação é diferencial entre os da própria espécie e os da outra espécie?

No limite, poderia considerar-se que a probabilidade média dum grão de pólen da outra espécie desenvolver um tubo polínico, e a deste chegar aos ovários e fertilizar é a mesma que a dum grão de pólen da mesma espécie; isso significaria não haver, na fase pré-zigótica, barreiras reprodutoras específicas à hibridação. Entretanto, o presente estudo foi feito durante um ano de frutificação que, tendo em conta os estudos de floração efectuados em paralelo (cf. secção anterior), faria esperar uma elevada taxa de hibridação em algumas descendências pelo menos, caso não houvesse barreiras reprodutoras específicas à hibridação.

Mas se de facto o grão de pólen da outra espécie tiver em média menos probabilidade de germinar no estigma receptivo do que os da própria espécie, e/ou se o subsequente tubo polínico for em média mais facilmente travado no seu desenvolvimento antes de chegar ao ovário, então há que acrescentar este factor de redução da probabilidade de hibridação, e a ausência de híbridos nas plântulas obtidas dos povoamentos mistos em 1998 parece corroborá-lo. Embora os estudos experimentais com

polinização controlada tendam a apoiar esta possibilidade [Boavida et al. 2001], a realidade é que ainda não foi abordada directamente, pela inclusão duma mistura de pólen das duas espécies. Isso não permite, nomeadamente, obter uma estimativa quantitativa da possível redução do sucesso da polinização interspecífica durante a fase pré-zigótica, que constituiria uma referência importante para o estudo de factores de risco de hibridação.

Mas, para além da probabilidade média há que contar com possíveis variações consoante os indivíduos envolvidos: da mesma maneira que há diferentes graus de compatibilidade entre indivíduos da mesma espécie [Yacine & Bouras 1997], também essa variação pode existir entre os de espécies diferentes [Kanazashi *et al.* 1997b]. Por isso é de admitir que a ocorrência de híbridos seja mais previsível quando se encontram próximos entre si um sobreiro e uma azinheira *compatíveis* e cuja floração, pelo menos nalguns anos, se sobreponha no tempo. Esta hipótese, sem excluir a possibilidade de ocorrerem híbridos por polinização a longas distâncias, poderia fornecer uma pista para a ocorrência de híbridos em apenas algumas áreas com povoamentos mistos (figura 5.1).

Deste modo, um dos critérios de elegibilidade de povoamentos de sobreiro para aproveitamento de semente para propagação, que é o de haver quando muito 15% de outras quercíneas (decreto-lei 205/2003, anexo IX, parte A), além de ser evidentemente arbitrário, pode revelar-se inútil: mesmo numa percentagem abaixo dessa, e dependendo das condições particulares que facilitem a polinização interespecífica, poderia ocorrer hibridismo.

Há ainda a possibilidade daquilo que ficou conhecido como “emasculação ambiental” em que, sob certas condições ambientais, a viabilidade do pólen da própria espécie ser de tal modo afectada que as flores femininas acabam por ser fertilizadas a partir de pólen doutra espécie. No contexto dos povoamentos mistos de sobreiro e azinheira em Portugal, tal fenómeno parece não ocorrer, até porque resultaria em povoamentos onde predominam híbridos, como no exemplo original [Williams *et al.* 2001], o que não parece acontecer com os cerqueiros em ponto algum da Bacia Mediterrânica.

Após a fertilização, existe a possibilidade de eliminação preferencial dos híbridos durante o desenvolvimento do embrião, durante o período após a deiscência até à germinação, durante a germinação ou durante o desenvolvimento da plântula. Não parece existir qualquer informação disponível, nem mesmo extrapolada doutros híbridos de *Quercus*, a este

respeito. Mas é provável que haja a eliminação sistemática dos cerqueiros jovens nas desmoitas (se se trata dos “negrais”, cf. secção B, terá de ser averiguado) em povoamentos onde só se pretende a regeneração de sobreiro. E existe a possibilidade da ocorrência dos híbridos coincidir com a ausência destas desmoitas selectivas.

D — Ideias para projectos de futuro

Dispondo-se de marcadores isoenzimáticos dos híbridos entre sobreiro e azinheira, abre-se a possibilidade de lançar linhas de investigação sobre várias questões relacionadas. Nesta secção revêem-se algumas dessas possibilidades, dando ênfase à maneira como se articulam com os resultados do presente trabalho e ao papel que a análise destes marcadores pode desempenhar.

1) Incidência de hibridismo em materiais de propagação

O potencial dos marcadores isoenzimáticos para análises em larga escala tem a sua aplicação mais evidente na amostragem dos materiais de propagação de sobreiro de proveniências portuguesas, especialmente aquelas que abrangem povoamentos mistos com azinheira. Os povoamentos mistos ocorrem um pouco por toda a distribuição de sobreiro em Portugal (tabela 5.1), e grande parte das proveniências contribuem para o material de propagação comercializado por viveiristas portugueses.

Tabela 5.1 — Distribuição dos povoamentos mistos em Portugal, por unidades territoriais, segundo uma estimativa feita em colaboração com a Associação Nacional de Empresas Florestais Agrícolas e do Ambiente (ANEFA), em 2001. As regiões de proveniência de sobreiro são as definidas por Varela [1997].

Região agrária	Região de proveniência	Unidades territoriais
Trás-os-Montes	III	Douro Superior (1%), Nordeste (9%)
Beira Litoral	II	Pinhal litoral (2,5%), Pinhal e Beira Serra (2,5%)
Beira Interior	V	Pinhal Interior Sul (5%) e Beira Interior Sul (5%)
Ribatejo e Oeste	IV	Tomar (4,5%), Abrantes (4,5%), Chamusca e Coruche (6%)
Alentejo	IV	Alentejo litoral (5,5%)
Alentejo	V	Alto Alentejo (16,5%), Alentejo central (22%), Baixo Alentejo (11%)
Algarve	VII	Barlavento (1,5%), Sotavento (3,5%)

Essa amostragem poderia ser feita ao longo do ano já com as plantas em pleno desenvolvimento. Visar-se-ia, numa primeira linha, a identificação de híbridos com um conjunto de marcadores diagnosticantes suficiente — a escolha recaindo provavelmente sobre DIA e MDH, no sistema de separação C, que deram provas de elevada consistência e facilidade de interpretação dos fenótipos “X”. Não haveria grande constrangimento logístico, com o necessário investimento em recursos humanos, para processar em poucos meses alguns milhares de amostras de cada ano (segundo os cálculos do projecto PAMAF 8153, realiza a extracção e análise no sistema C, 450 amostras por mês para um técnico). A incidência sobre povoamentos mistos seria particularmente relevante no esclarecimento dos pressupostos para a certificação de semente como seleccionada (como definido no anexo IX, parte A, do decreto-lei 205/2003, cf. secções B e C2 e “Introdução”), entretanto em vigor, que é obrigatória para os materiais de propagação de sobreiro (artigo 17º desse decreto). Mas não é de excluir a utilidade de estender o rastreio a materiais de povoamentos “puros”, incluindo de proveniências estrangeiras que sejam criadas em viveiros portugueses.

Uma vez encontradas plantas com zimogramas de híbridos, outros marcadores têm de ser investigados para verificar esse hibridismo em todos, o mesmo tendo de fazer-se para as restantes amostras das respectivas proveniências, o que no espaço de 1 mês (ou até mais), usando a metodologia desenvolvida no presente trabalho, não requer a produção de mais extractos dos mesmos indivíduos.

A partir daqui, pode considerar-se prioritário, ou não, intensificar a amostragem de materiais de viveiro das proveniências em causa, ou fazê-lo apenas para as frutificações dos anos seguintes. A análise dos registos climáticos mais próximos geograficamente, na Primavera anterior, é importante para servir de padrão para futuras observações da fenologia da floração nas duas espécies em cada proveniência, acompanhadas por registos edafoclimáticos durante cada época, para depois recolher-se semente (nos sobreiros e nas azinheiras) na respectiva época de frutificação. Como potencial factor de risco de hibridação (“emasculação ambiental” [Williams *et al.* 2001]), a viabilidade do pólen de azinheira (e eventualmente de sobreiro) deve ser investigada nestes povoamentos. A viabilidade e sobrevivência em viveiro das descendências recolhidas destes povoamentos também deve ser registada.

Os resultados principais a esperar dum tal estudo são a identificação de proveniências onde ocorrem plantas híbridas que podem ser vendidas em

viveiro, e a estimativa de quantas ocorrem nos diversos anos. Complementarmente, há a oportunidade de caracterizar morfológicamente esses híbridos em fase de plântula, caso seja divergente da descrição botânica [Vasconcelos & Franco 1954], e a de aumentar o conhecimento sobre as condições edafoclimáticas que facilitam a polinização interspecífica.

Além disso, pelo facto de também se estudarem as condições locais de formação de híbridos, esta linha de trabalho permite uma melhor definição dos factores de risco de hibridação entre sobreiro e azinheira, que pode ter reflexos positivos na gestão dos povoamentos mistos e do aproveitamento da semente neles produzida.

2) Biologia da reprodução dos cerqueiros

Quanto maior for o número de carvalhos cerqueiros inventariados, mais relevantes serão as conclusões que se podem tirar sobre a sua fertilidade com pólen de sobreiro e de azinheira, que para já só conta com dados bastante limitados, havendo até a possibilidade duma das árvores (SM2) não ser um híbrido mas sim descendente de híbrido. Seria desejável obter em cada ano algumas dezenas de plantas descendentes de cada híbrido (o que pode não ser fácil nalgumas árvores) e analisar o máximo número possível de marcadores enzimáticos, complementados por outros marcadores genéticos (cf. secção 5). As questões relacionadas com a viabilidade do pólen dos cerqueiros e a germinação e sobrevivência em viveiro das suas descendências podem ser relevantes.

Também faz parte da biologia da reprodução dum híbrido estudar as descendências de azinheiras ou sobreiros na sua imediata vizinhança, sobretudo se se presumir que a receptividade das flores femininas dalgumas dessas árvores coincide com a emissão de pólen recombinante pelo híbrido — é de presumir que uma parte relevante do pólen que essas árvores recebem provém do híbrido que lhe está próximo. Esta abordagem justifica-se também para compensar a falta de informação disponível nos híbridos em que a produção de semente seja reduzida.

Os resultados da análise isoenzimática das descendências dos híbridos permitem testar se em todos os híbridos existe uma distribuição igual entre pólen de sobreiro e de azinheira, estimar a percentagem de pólen recombinante que recebem, verificar se o aparecimento de descendentes de pólen dos híbridos nas árvores vizinhas depende da coincidência entre datas de floração, e ainda testar a ligação cromossómica entre os *loci* discriminantes (enzimáticos e outros).

Se em paralelo for realizada a linha de trabalho descrita na secção anterior, pode vir a dispor-se duma grande riqueza de informações que conduzam ao melhor conhecimento da dinâmica de formação de híbridos e subsequente manutenção de introgridos nos povoamentos (cf. parte I secção A).

Finalmente, pode perspectivar-se transferir estas plantas para um local definitivo, para acompanhar o desenvolvimento da cortiça e tentar correlacionar variações na sua expressão com a presença de certos marcadores genéticos (isoenzimáticos ou outros) ou de certas variantes alélicas de genes candidatos e sua expressão no felogene. Nomeadamente, tentar-se correlacionar com a cortiça preguenta de modo a determinar o grau de introgressão, se de facto é o que se trata, envolvido na sua formação (cf. secção seguinte). Evidentemente, por precaução, estes “pomares de notomorfos” teriam de encontrar-se a uma distância suficientemente grande (talvez 10 km [Streiff *et al.* 1999]) de sobreiros ou azinheiras, para evitar cruzamentos indesejáveis.

3) Investigação dos sobreiros de cortiça preguenta

O presente estudo apenas afluou a análise dos sobreiros de cortiça preguenta, como possível aplicação dos marcadores discriminantes. Não havendo nada de conclusivo, há porém dados suficientes para delinear essa aplicação de maneira mais incisiva.

Na hipótese destes sobreiros terem introgressão de genes de azinheira, a sensibilidade da detecção depende do número de marcadores genéticos diagnosticantes, que idealmente terão de ser muitos e distribuídos uniformemente pelo genoma. O facto de ter-se detectado o que parece ser introgressão, no *locus* de DIA e possivelmente num dos *loci* de PER, sendo tão poucos os marcadores utilizados neste estudo, se não for um golpe de sorte é porque a percentagem do genoma de sobreiro não precisa de ser muito próxima de 100% para um sobreiro parecer como tal; nesse caso, e tendo em conta que o extenso contacto que existe actualmente entre as duas espécies não deve ser anterior às últimas décadas do século XIX (“Revisão bibliográfica”, parte III, secção A), a separação entre eventos de hibridismo e os actuais descendentes de híbridos que possam existir não deve ir além de 2 gerações. A ser verdade, os marcadores enzimáticos podem ter a sensibilidade necessária, mas evidentemente têm de ser complementados por outros, e é de grande importância incluir caracteres morfológicos, para além da qualidade da cortiça, que em paralelo devem assinalar introgressão caso a mesma exista (cf. tabela 2.3,

“Revisão bibliográfica” parte III secção C3).

Como referido na secção anterior, a análise dos notomorfos nos locais definitivos pode vir a trazer pistas sobre quais os *loci* mais importantes para investigar nos sobreiros de cortiça preguenta.

Em termos de abordagem experimental, a investigação do estatuto genético dos “negrais” seria idêntica; em termos de amostragem, geralmente não sobrevivem para além duma fase precoce no campo, precisamente porque se distinguem morfológicamente dos sobreiros típicos. Se houver “negrais” adultos, então pode averiguar-se até que ponto eles se distinguem da norma nesta fase, nomeadamente em termos de qualidade da cortiça que produzem. Alternativamente, a diferença morfológica dos “negrais” pode ser uma manifestação precoce de plasticidade fenotípica, sem relacionar-se com a introgressão de genes de azinheira.

4) Inventariação de híbridos e seus descendentes

É importante continuar-se o inventário de carvalhos cerqueiros, não só pelo valor que tem em si mesmo mas pela possibilidade que dá de cada vez melhor definir os factores de risco de hibridação entre sobreiro e azinheira. A esse inventário também interessará associar um outro, decorrente das análises que se venham a realizar, de indivíduos, povoamentos e unidades territoriais onde incide introgressão de azinheira em sobreiro (e também vice-versa). Todos os indivíduos inventariados devem ser analisados para o máximo número possível de marcadores diagnosticantes.

5) Complementaridades a cultivar

Outros marcadores moleculares

Os marcadores de DNA podem complementar os enzimáticos, não só porque acrescentam outras potencialidades, mas porque provavelmente se localizam em pontos do genoma diferentes e assim podem preencher lacunas de sensibilidade destes últimos, nomeadamente para a análise de indivíduos introgridos (plantas de viveiro, descendentes dos híbridos e das árvores que os circundam, sobreiros de cortiça preguenta). Os progenitores de cada híbrido — seja os que se encontram no campo, especialmente se forem relativamente jovens, seja os que se detectam nos materiais de viveiro — podem eventualmente ser encontrados na proximidade, para tal sendo fundamental a utilização de análises em muitos *loci* (designadamente, AFLPs) ou em *loci* com grandes séries

alélicas (nSSRs [Soto *et al.* 2003] e SSCPs), e a diagnose do progenitor feminino (cpDNA).

O principal problema com estes marcadores é o custo por amostra e o tempo de realização, que podem ser proibitivos em contextos como o de rastreios em larga escala. Segundo a questão onde podem ser aplicados, e as respectivas exigências, assim a prioridade maior será para os marcadores enzimáticos ou dos marcadores de DNA. Em qualquer das situações que se coloque, não pode menosprezar-se a complementaridade entre uns e outros.

Estudos sobre a reprodução

Nas secções que precedem, os estudos fenológicos da floração em sobreiro e azinheira são constantemente referidos, pois como se demonstrou na análise dos resultados do projecto PAMAF 8153, constituíram importante complemento para a sua interpretação (cf. secção C). É um exemplo paradigmático da sinergia que resulta de duas abordagens ao mesmo problema, neste caso a reprodução sexuada em sobreiro e azinheira em povoamentos mistos. Porém, deve realçar-se a intensidade com que os recursos humanos se têm de envolver durante a época de floração para obter resultados tão detalhados como os do povoamento da Mitra em 1998.

Outra complementaridade vem dos estudos com polinizações controladas. Esta abordagem é a que permite compreender os factores envolvidos na eliminação dos tubos polínicos (cf. “Revisão bibliográfica” parte II, secção C). São muitas as abordagens já exemplificadas na bibliografia existente, todas com méritos importantes mas nenhuma delas considerando um aspecto fundamental: a aplicação de pólen de sobreiro e azinheira misturados. Note-se que até ao presente estudo não se dispunha de marcadores genéticos que permitissem identificar a origem do grão de pólen para cada descendente, mas existindo agora essa possibilidade, com marcadores enzimáticos pelo menos, a utilização de misturas de pólen é incontornável. Também devem resolver-se as dificuldades experimentais encontradas na polinização de sobreiro [Boavida *et al.* 2001]. E deve ter-se em conta a verificação de variações na compatibilidade entre indivíduos das duas espécies, na presunção de ser um factor de risco de hibridação (secção C2).

6) Precauções importantes *a priori*

O projecto PAMAF 8153 definiu um protocolo de trabalho que permitiu responder a algumas questões com bastante clareza, e que devem

ser levadas em conta no planeamento doutros estudos: selecção de povoamentos representativos, complementaridade com estudos da floração no campo, criação das descendências em viveiro, extracção dos enzimas das folhas.

Por outro lado, houve aspectos da amostragem que não puderam ser corrigidos, e que requerem a maior atenção caso se pretenda uma análise familiar: a colheita de sementes já caídas no solo deve ser abolida (no caso das copas muito altas, pode cobrir-se o chão com um pano e varejar a folhagem), cada povoamento deve ser visitado várias vezes em cada época de frutificação para que não se excluam famílias inteiras, e o número de descendentes por árvore deve ser uniformizado.

Parte III: A biologia da reprodução e o hibridismo

A — Polimorfismos intraspecíficos

Dois polimorfismos intraspecíficos (*locus Pgm* de azinheira e *locus Pgi-B* de sobreiro) foram analisados em detalhe para caracterizar a biologia de reprodução das duas espécies e assim verificar se se aplicam (ou não) certos postulados relativos à incidência de híbridos. Tanto quanto é dado verificar, o de *Pgm* não foi descrito em azinheiras em nenhum outro estudo até à data.

Sendo inabitual recorrer-se a um único *locus* por espécie para tirar quaisquer conclusões, não deixa de ser verdade que os resultados da análise nesse *locus*, se for neutral e a amostragem das populações representativa e com dimensão suficiente, são teoricamente os mesmos que para todos os segmentos do genoma que também forem neutrais.

1) Frequências dos alelos

Tanto o *locus Pgm* de azinheira como o *Pgi-B* de sobreiro sugerem que os povoamentos mistos eram suficientemente homogéneos entre si para serem considerados (em cada espécie) uma só população. Podem considerar-se pelo menos dois factores, eventualmente convergentes entre si, para este resultado: primeiro, nuvens polínicas comuns (a partir das frequências dos gâmetas masculinos das tabelas 4.30 e 4.31, determina-se um G_{ST} de 2,21% para *Pgm*, relativamente baixo, e de 0,51% para *Pgi-B*, ainda mais baixo), sugerindo que a migração via pólen é suficientemente

intensa para contribuir para a homogeneidade, apesar das distâncias serem na ordem das dezenas de quilómetros; e segundo, a intervenção de forças selectivas homogenizadoras, por exemplo selecção contra os homozigóticos (cf. secção 2).

Quando testada a hipótese das frequências do conjunto dos povoamentos mistos (adultos) serem próximas das previstas pelo modelo de Hardy-Weinberg, ela não foi rejeitada nem para *Pgm* nas azinheiras nem para *Pgi-B* nos sobreiros. Já nas populações de referência (plantas de viveiro) nota-se o contraste entre os dados para *Pgm* (desvios quando muito pouco significativos) e os de *Pgi-B* (rejeição da hipótese com erro tipo I de $1,2 \times 10^{-5}$), neste último devido ao pronunciado déficit de heterozigóticos “ab” (e concomitante excesso de homozigóticos “a” e “b”), traduzido num coeficiente de fixação $F = 0,33$. Estes resultados sugerem duas coisas: primeiro, que a estrutura populacional varia com a fase do ciclo de vida; segundo, que as condicionantes sobre os dois *loci* em causa são diferentes — parece mais apropriado referirem-se estas diferenças aos *loci* e não às espécies, ou seja, implicar mecanismos selectivos específicos para cada *locus* em vez de postular diferenças na biologia populacional de sobreiro e azinheira, que parecem ser mínimas. Esta questão também será retomada na secção 2.

2) Coeficientes de fixação

Uma maneira de definir um coeficiente de fixação é como uma medida, positiva ou negativa, do afastamento da frequência de heterozigóticos observados (H_o) em relação à esperada (H_e) no modelo de Hardy-Weinberg. Dispondo de estimativas de F para adultos, gâmetas e plantas jovens nos povoamentos mistos, observam-se flutuações neste parâmetro que, salvo erros de amostragem, podem ser interpretados em função de factores populacionais que possam afectar a frequência de heterozigóticos. Na figura 5.3 representam-se estas flutuações para os *loci* *Pgm* de azinheira e *Pgi-B* de sobreiro.

As estimativas de F na fase gamética são os valores de F_{esp} obtidos no modelo II (tabela 4.32), isto é, são a expressão da correlação negativa entre as frequências alélicas nos gâmetas que originaram as plantas analisadas, estimada a partir da diferença entre as frequências no pólen e as frequências nas plantas (cf. Apêndice II secção C). Esta correlação negativa é particularmente acentuada no *locus* *Pgm* e parece significar uma forte selecção contra a formação de homozigóticos na fase pré-zigótica, entre a polinização e a fertilização. Em contraste, no *locus* *Pgi-B*

quase não há desvio de F_{esp} em relação ao valor 0 (o que se reflecte na semelhança das estimativas de N_e pelos dois modelos, na tabela 4.32).

Considerando as condições ideais de armazenamento, sementeira e criação em viveiro, e assumindo que nenhum destes *loci* está envolvido em variações na capacidade de germinação das sementes, é plausível que as flutuações de F desde a conjugação até às plantas de viveiro são neutrais. Se o forem, então o ΔF na tabela 4.32 será uma boa estimativa do acréscimo de homozigóticos na conjugação que reflecte a limitada diversidade genética disponível para fertilizar cada árvore, como indicam os valores de N_e na tabela 4.32 (4,66 para *Pgm* e 5,87 para *Pgi-B*). O gráfico da figura 5.3 mostra como o aumento do F nesta fase é pronunciado, e quase paralelo entre os dois *loci*, como aliás se esperaria entre espécies com biologias de reprodução semelhantes³.

Se a taxa de autopolinização for baixa, como parece poder generalizar-se neste género [Cecich 1997a, Yacine & Bouras 1997, Boavida *et al.* 2001, Williams *et al.* 2001, Fernández-M. & Sork 2005], um valor de N_e baixo implica que o pólen aparentado geneticamente terá de vir doutras árvores, nomeadamente daquelas (poucas) na imediata vizinhança que estarão individualmente mais representadas na descendência (cf. “Revisão bibliográfica” parte II secção D1). Admitindo que nos adultos férteis não existe autocorrelação espacial, e portanto que não há parentesco entre os polinizadores mais próximos e as árvores polinizadas, os baixos valores de N_e terão de explicar-se por factores como a dispersão intraspecífica das datas de ântese desses polinizadores (cf. parte II, secção C1; efeito de Wahlund “temporal” [Chung *et al.* 2002]).

Tendo em conta a estimativa de F_{ST} para *Pgm* nas plantas jovens, e consequente dedução duma estimativa de N_{em} assumindo neutralidade selectiva, a utilização do valor $N_e = 4,66$ no mesmo material implica um

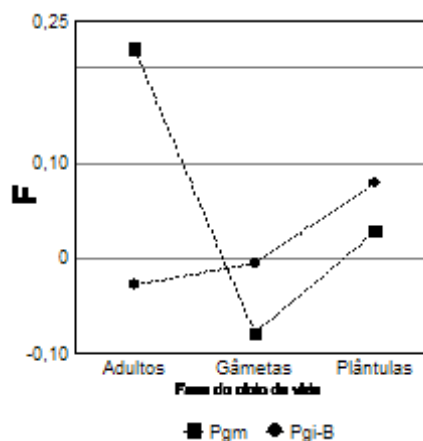


Figura 5.3 — Flutuação do coeficiente de fixação nos materiais dos povoamentos mistos, tomados como uma só população de cada espécie, durante os ciclos de vida de azinheira e sobreiro, calculada a partir das distribuições genotípicas de *Pgm* e *Pgi-B*, respectivamente (tabelas 4.20, 4.22, 4.24, e 4.26 para os adultos, e tabela 4.32, modelo II, para gâmetas e plantas jovens).

³ Outra maneira de explicar esse acréscimo seria por selecção contra os heterozigóticos nos dois *loci*, que se opta por não considerar apesar de não haver informações objectivas que permitam excluí-la totalmente.

valor bastante elevado da taxa de migração $m = 0,315$. Em princípio, este valor deve interpretar-se como um indicador de grande fluxo genético entre os povoamentos, o que pode admitir-se no abstracto, tendo em conta as observações que a maior parte do pólen que fertiliza cada árvore provém de fora do respectivo povoamento [Streiff *et al.* 1999]. Mas a distância entre os povoamentos mistos está para além do alcance médio das nuvens polínicas, estimado em menos de 10 Km noutros *Quercus* [Streiff *et al.* 1999].

Uma explicação alternativa para o valor de m encontrado, e que permanece válida mesmo com a estratificação dentro de cada povoamento (baixo N_e), é a existência de selecção estabilizante que faça convergir as frequências dos diferentes povoamentos para valores semelhantes (cf. “Revisão bibliográfica” parte IV, secção B1). Como ilustra a figura 4.17, as diferenças em *Pgm* entre as frequências nos gâmetas foram muito pronunciadas (daí a correlação negativa expressa em F_{esp}), sugerindo uma selecção pré-zigótica análoga à autoincompatibilidade, que pode considerar-se do tipo estabilizante. No caso de *Pgi-B* não existe nenhuma evidência directa da acção selectiva, a não ser que se assuma que o valor de F voltaria a ser negativo depois do desenvolvimento dos indivíduos que sobrevivessem até à fase adulta no local definitivo, por sobrevivência preferencial dos heterozigóticos neste *locus*. As actividades PGI são notórias pela tendência para a complementaridade funcional entre isoenzimas que favorece os heterozigóticos, fazendo recair a acção da selecção estabilizante no próprio *locus* e não noutros *loci* da mesma região cromossómica [Watt 1983, 1992]. A melhor maneira de colocar à prova esta hipótese será a verificação da sua generalidade (isto é, a variação do gráfico na figura 5.3) em tantos povoamentos quantos seja possível, tanto nos sobreiros como também em azinheiras. E, evidentemente, com maior número de famílias por povoamento.

Os valores de F nas plantas das populações de referência são superiores aos respectivos dos povoamentos mistos (particularmente na de sobreiro, $F = 0,33$), mas é possível que a maior estratificação aparente nessas populações reflecta apenas o modo como foram colhidos os lotes de semente; no essencial, não há contradição com os resultados nas plantas na figura 5.3, pois reitera-se o valor mais elevado de *Pgi-B* em relação ao de *Pgm*.

O modelo II foi importante sobretudo para corrigir a análise no *locus Pgm*, onde a correlação genética negativa entre os gâmetas foi mais acentuada ($F_{esp} = -0,079$). A escolha da diferença entre as frequências no

pólen (estimadas por análise familiar) e nas plantas jovens, para determinação dos Δx_i , resulta de serem as que provavelmente têm menor erro de amostragem, dada a dimensão da mesma (304 indivíduos). O valor de F neste *locus*, para os adultos (figura 5.3), é provavelmente um reflexo da amostragem limitada (60 indivíduos).

A possibilidade de haver contaminantes entre famílias, não detectados, é uma fonte de erro nestas frequências que seria evitada se se assegurasse que a colheita das sementes era feita directamente na árvore.

B — Implicações para a formação de híbridos

Na secção anterior deduziram-se aspectos da biologia da reprodução de azinheiras e sobreiros que podem considerar-se também factores relevantes para a formação de híbridos entre estas duas espécies.

Considerando que a possibilidade de ocorrer um híbrido implica uma exposição substancial duma das espécies ao pólen da outra espécie, e que os indivíduos mais próximos topograficamente e com data de floração próxima são os mais representados na descendência, então o risco de hibridismo será mais previsível se se verificarem cumulativamente:

- i) sobreiros precoces na imediata vizinhança de azinheiras tardias,
- ii) pólen daqueles a atingir estigmas receptivos destas (eventualmente vice-versa), e
- iii) suficiente compatibilidade entre indivíduos.

A condição *ii* dependerá fortemente das datas de floração em cada ano, sendo os anos com um período de tempo significativo de sobreposição entre as florações das duas espécies os que requerem maior atenção. As condições *i* e *iii* são relativas ao grau de risco de hibridismo e justificariam um estudo especializado nos casos que correspondam à condição *i*. No caso dos três povoamentos mistos estudados, há muitos contactos próximos entre indivíduos das duas espécies (cf. Apêndice I secção B), mas é possível que em nenhum caso houvesse simultaneidade de floração entre árvores contíguas (pelo menos na Mitra isso é certo para 1998 [Varela *et al.* em preparação]).

A existência de selecção estabilizante, sugerida no presente trabalho tanto para o *locus Pgm* de azinheira (correlação negativa entre gâmetas) como para o *Pgi-B* de sobreiro (eliminação preferencial de plantas homozigóticas), não deve generalizar-se a outros *loci* que em cada espécie são monomórficos e nas linhagens híbridas passam a ser heterozigóticos. Por recombinação nos híbridos, dá-se início a novas combinações genotípicas interespecíficas que normalmente são inconsistentes

adaptativamente (quando não o sejam, dá-se a oportunidade para surgir uma nova hibrid-espécie), que quando muito tenderão a reconstituir as espécies originais por retrocruzamento (cf. parte II secção A2).

A amostragem de materiais orientada por estas hipóteses sobre os riscos de hibridação, desde que se aumente a informação sobre a sua plausibilidade, pode vir a ser uma abordagem complementar à do rastreio de proveniências (cf. parte II, secção D1), e a obrigatoriedade de acompanhar o progresso nesta linha de análise com um estudo mais aprofundado da biologia de reprodução intra-específica, se possível com um grande número de *loci*, transcende até a própria temática do hibridismo, embora lhe seja interdependente.

Parte IV: Metodologia

A — Análise crítica

1) Modelo de amostragem

A opção que se tomou de analisar as descendências nos povoamentos marcados trouxe uma dimensão adicional à análise dos dados: a de estudar-se a biologia da reprodução das duas espécies e dos híbridos (cf. parte III e secção A3 da parte II, respectivamente), cujo interesse tanto no estudo dos factores do hibridismo como em questões mais gerais foi já sublinhada nesta discussão. A interdependência entre modelo de amostragem e horizontes de investigação é, sem dúvida, um factor sempre a considerar da maior importância, assim como é a sua adaptação a métodos de análise de dados entretanto desenvolvidos [Smouse *et al.* 2001, Austerlitz & Smouse 2001, Smouse & Sork 2004, Vekemans & Hardy 2004, Walter & Epperson 2004].

Para evitar contaminações de semente e para recolher o máximo de informação para um estudo, é absolutamente fundamental fazer a colheita de semente na árvore, assegurando que todo o subsequente processo de etiquetagem mantenha a identificação com a árvore-mãe, e ainda ter o cuidado de registar as taxas de germinação por família, assim como as variações no vigor de crescimento (relevantes por causa dos pressupostos de selectividade sobre certos genótipos).

No contexto de controlo do hibridismo em materiais de propagação (cf. parte II secção D1), e face às realidades da amostragem *in situ* onde é inviável controlar e muito menos uniformizar o protocolo de colheita de

sementes de todas as proveniências, tem de haver especial cautela em deduzir que um povoamento é “livre de riscos” de hibridação. Há nomeadamente dois factores a ter em conta: a possibilidade de variação, de ano para ano, nas oportunidades de polinização heterospecífica, que implica repetir as análises ao longo de vários anos de frutificação, de preferência em coordenação com estudos de floração que vão registando as flutuações de datas de emissão de pólen; e a maturação assíncrona dos frutos das diferentes árvores, pois para garantir a representatividade da amostragem em cada povoamento têm de fazer-se colheitas de todas as árvores, e por isso é necessária a programação das colheitas de semente em várias datas.

Para assegurar a colaboração dos proprietários, na recolha de sementes segundo um padrão adequado ao rastreio com marcadores genéticos de hibridismo, seria útil abrir a possibilidade de aprovar os povoamentos mistos como produtores de materiais de propagação, na condição de sujeitarem-se a esse rastreio durante alguns anos e no estrito cumprimento do padrão de recolha.

2) Sementes vs. folhas

Para uma compreensão mais aprofundada dos sucessivos estádios, pós-polinização, na manutenção do isolamento reprodutor entre as duas espécies e na biologia de reprodução dos próprios híbridos, a análise cada vez mais intensiva dos diferentes pontos do ciclo de vida seria fundamental, integrando designadamente o pólen, as sementes (eventualmente os frutos abortados) e as plantas que destas se desenvolvem; tanto se pode pensar em análises de larga escala em povoamentos mistos marcados, como num simples complemento de estudos de polinização controlada, onde os marcadores discriminantes podem contribuir de forma extremamente relevante viabilizando a experimentação com misturas de pólen [Kanazashi *et al.* 1997b].

É fundamental que os mesmos marcadores enzimáticos sejam utilizáveis em todos esses pontos do ciclo de vida. Uma parte dos que foram utilizados em larga escala nas plantas, no presente estudo, continuaram a sê-lo nas sementes, mas algumas anomalias (ausência de zimogramas DIA “X”) e o facto de ainda não saber-se o poder diagnosticante das actividades que apresentarem zimogramas muito diferentes em sementes (PGM e GsR), exigem algum esforço adicional. Definir a correspondência genética entre sementes e folhas deverá fazer-se pela comparação dos zimogramas do mesmo indivíduo nessas duas fases do seu

desenvolvimento, implicando algumas complicações adicionais: identificar cada planta com a respectiva semente, o que pode conseguir-se com um mapa de sementeiras de cada tabuleiro; e avaliar se a ablação de parte dos cotilédones para extracção afecta a taxa de germinação ou a de sobrevivência em viveiro, o que pelo menos durante alguns ensaios impõe a manutenção de controlos em paralelo.

Pelo menos para fins de investigação, uma alternativa à germinação em viveiro das sementes colhidas poderia ser a cultura *in vitro* de explantes retirados assepticamente para embriogénese somática ou micropropagação a partir de calos. Existe um potencial de economização em tempo e mesmo em custos em optar-se por esta via, e embora se tenham obtido resultados encorajadores no Laboratório de Melhoramento Vegetal e Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (Prof^a Amely Zavattieri), será necessário desenvolver muito mais essa investigação.

3) Método de extracção

Dependendo dos recursos humanos disponíveis, e tendo o cuidado de assegurar a possibilidade de manutenção do material a analisar em viveiro, podem atingir-se níveis de amostragem muito elevados com custos operacionais razoáveis. A preços de 1999, cada amostra custava pouco mais de 0,25 € para a extracção, e se se lhe juntasse a análise básica com marcadores do sistema C, o custo acumulado ficava por 0,60 €.

Mais do que o custo em reagentes para as extracções e análises, é o tempo de processamento de cada amostra, estimado em 6 amostras por hora para cada pessoa só para o passo de extracção, que constitui o factor mais limitante no planeamento de análises em larga escala. A extracção eficaz dos constituintes celulares a partir do material foliar dos sobreiros e azinheiras só se conseguiu pela combinação de maceração sob Azoto líquido, homogenização a alta velocidade e centrifugação. Sem os dois primeiros processos as actividades enzimáticas não são detectáveis no gel, mas é de admitir a possibilidade de encontrar-se um protocolo tanto ou mais eficiente e menos demorado.

Um aspecto do passo de extracção que poderia ser revisto é a composição do meio de extracção. É possível que a sua complexidade seja um factor de inactivação dalgumas actividades enzimáticas [Soltis *et al.* 1983, Kephart 1990, Bult & Kiang 1993], que pode torná-las mais difíceis de detectar, algumas ao ponto de serem inconsistentes. Infelizmente, todas as tentativas de utilizar um tampão mais simples, com

polivinilpirrolidona insolúvel (PVPP) para a adsorção de taninos das folhas [Yacime & Lumaret 1989], produziram extractos cujas actividades enzimáticas, se presentes, não eram reveláveis. No entanto, este método permitiu caracterizar os polimorfismos de LAP, IDH e ACP descritos em azinheira [Michaud *et al.* 1995] e sobreiro [Toumi & Lumaret 1998], em estudos também baseados em material foliar. Outro tampão mais simples que parece dar bons resultados com folhas de carvalhos americanos é o de Mitton *et al.* [1977], suplementado com 10% PVP [Sork *et al.* 1993b].

A manutenção dos extractos a -20°C pode ter-se traduzido, pelo menos em parte, na exigência de maior complexidade do meio de extracção, mas por causa das contingências de cumprimento dos calendário do projecto PAMAF 8153 não puderam efectuar-se as experimentações necessárias a chegar a um novo meio (e método) de extracção mais eficaz. Para o meio de extracção usado no presente trabalho, pouco mais se pôde aperfeiçoar além de definir-se uma selecção de componentes com resultados fiáveis, e em concentrações directamente retiradas da literatura disponível.

Apesar da relutância que em geral se tem em fazer a experimentação com o meio de extracção [Kephart 1990], ela deverá em princípio ser compensadora; mais do que a substituição de ingredientes por outros, deveriam testar-se sistematicamente os efeitos de remover ou de apenas reduzir a concentração de vários entre eles.

4) Actividades enzimáticas utilizadas

Cada uma das actividades enzimáticas utilizadas nas análises de rotina teve as suas particularidades tanto na contribuição para a discriminar entre sobreiros e azinheiras (e híbridos), como nos obstáculos que se colocaram (tabela 5.2).

DIA é sem dúvida um marcador de eleição, apesar da relativa complexidade dos zimogramas, que talvez se possa tornear utilizando outro sistema de separação (no sistema R, pelo menos, isso verificou-se, mas os zimogramas eram menos visíveis); ainda não é possível dizer se as variantes observadas em sobreiro e azinheira são verdadeiramente intra-específicas (embora não polimórficas, pela sua raridade) ou resultam de introgressão, e há o problema das sementes descendentes de híbridos não terem apresentado zimogramas “X”.

MDH, embora em geral de grande utilidade, apresenta alguns problemas de visualização das bandas do lado catódico, especialmente nas azinheiras e nos híbridos, e é particularmente exigente em relação à

separação electroforética para permitir uma boa resolução das bandas do lado anódico; estes problemas talvez sejam resolvidos com outro sistema de separação, e um zimograma mais simples poderá também ajudar à dedução da genética dos marcadores do lado anódico.

A banda 1 de PER parece ser resolúvel em bandas polimórficas no sistema 4. Quanto à detecção de introgressões, a reduzida especificidade deste marcador relega-o para um papel meramente acessório, que mesmo assim não deixa de ser relevante como foi exemplificado na análise de sobreiros preguntos. A ausência dessa banda em sementes reduz muito o interesse de PER, mas com recurso a alternativas ao método de revelação [Gabriel 1971, Heeb & Gabriel 1984, Gabriel & Gersten 1992] podem simplificar-se outras regiões dos zimogramas e até trazer novos motivos de interesse, por exemplo a análise de polimorfismos intra-específicos.

PGI tem dois problemas, o da reduzida sensibilidade (perto de 20% de falsos negativos em termos de azinheiras, e quase 40% nos híbridos e suas descendências) e o da falta de resolução das bandas para uma caracterização precisa dos polimorfismos. A utilização de camada de agarose para a revelação desta actividade permite resolver o segundo problema muito satisfatoriamente.

EST é de visualização delicada, sobretudo se o zimograma produzido não for intenso, requerendo treino para evitar erros de avaliação. A falta de conhecimento sobre a genética deste carácter coloca alguns problemas na interpretação dos polimorfismos. A inclusão de α -butirato na solução de revelação melhorou um pouco a qualidade dos zimogramas, e poderiam tentar-se outros substratos para aumentá-la ainda mais.

A complexidade do zimograma de GsR, à semelhança de DIA, sugere o recurso a outro sistema de separação, neste caso até com a expectativa acrescida de melhorar-se a visibilidade (e a consistência) caso as múltiplas bandas coalesçam entre si, como se espera do alelismo num só *locus*⁴.

PGM já foi objecto de várias tentativas de optimização que desembocaram na redução da cor de fundo (metade do tetrazólio) e pela limitação do tempo de electroforese (para impedir a inactivação dos enzimas). Sobretudo pelo interessante polimorfismo em azinheira, uma investigação de alternativas ao sistema de separação H pode revelar-se

⁴ Resultados preliminares confirmam esta previsão, sem perda da capacidade discriminante entre sobreiro e azinheira, usando o sistema R e, talvez melhor ainda, o sistema "9". A utilização da camada de agarose não é necessária.

compensadora.

Embora a sensibilidade associada à banda 2b de PGD seja reduzida, ela não deixa de ser útil como marcador acessório (cf. tabela 4.17, amostra 38.8), mas ainda não foi possível confirmar a genética que está subjacente a esta variante em azinheira. A tentativa de demonstrar esta actividade noutros sistemas de separação prende-se mais com a exploração doutros polimorfismos, que no sistema H se apresentam com diferenças de migração demasiado subtis, e também melhorar a visualização em extractos de folhas (nas sementes é bastante mais intenso).

5) Sistemas de separação utilizados

Tal como foi levado à prática no presente estudo, cada amostra foi submetida a análises em 3 sistemas de separação (C, R e H) para 9 actividades enzimáticas (das quais 8 praticamente constantes, cf. tabela 5.2). A opção de analisar 5 actividades no mesmo gel comportava um maior risco de problemas técnicos em análises de rotina, e a exploração sistemática doutros sistemas de separação acabou por ser preterida em favor de completarem-se os rastreios necessários com as referidas 8 actividades. Mas, como se pode ver pelas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 e se recapitula na tabela 5.3, é de esperar que muitas outras se revelem de interesse.

Embora os três sistemas mais utilizados sejam os únicos onde se pode afirmar que existem bons marcadores para a detecção e análise do hibridismo, e que também entre eles se podem experimentar alternativas a esses marcadores, é evidente o potencial dos sistemas “9” e “4”, eventualmente do “M” se também for explorado sistematicamente⁵.

Acrescentam-se ainda aquelas que (especialmente na tabela 4.4) não foram demonstradas, mas que podem vir a sê-lo quando a electroforese seja em sistemas que não foram testados até agora.

Reiterando afirmações anteriores (cf. parte II, secção D), a expansão de marcadores genéticos é mais do que um exercício de técnica: para além de otimizar as análises de rotina, é necessária uma cobertura tão exaustiva quanto possível dos genomas, numa perspectiva de complementaridade com marcadores de DNA, para a detecção de introgressões e análise das descendências dos híbridos.

⁵ Resultados preliminares entretanto obtidos dão boas indicações para o sistema “9” para a demonstração de IDH, PER e GsR.

Tabela 5.2 — Caracterização qualitativa das 8 actividades utilizadas nas análises de rotina no presente trabalho, ordenadas pelo sistema de separação (Separ.), em termos de especificidade, sensibilidade, consistência, facilidade de visualizar, e consistência na resolução de bandas discriminantes. Também se regista se há conhecimento sobre a genética dos marcadores, se há polimorfismos intraspecíficos, e juntam-se comentários sobre necessidades de optimização. Realçam-se ainda os aspectos menos favoráveis em cada um (caixas). A linha de PER refere-se apenas à banda 1. Onde houver dois valores separados por barra, o primeiro é para sobreiro e o segundo para azinheira.

Separ.	Activ.	Especific.	Sensibil.	Consist.	Visibilidade	Resolução	Genética	polim.	Optimização
C	DIA	+++	+++	+++	+++	+++	✓	–	Outro sistema? Sementes
	MDH	+++	+++	+++	++ (/+ cat.)	+	✗ (✓ cat.)	–	Outro sistema?
	PER (1)	+	+++	+++	+++	++	✗	+	Sistema 4, sol. revelação? Sementes
R	PGI	+++	+	+++	+++	+	✓	+	Agarose
	EST	+++	++	++	+	+++	✗	+	Substratos
H	GsR	+++	+++	+	+++	+	✓	?	Sol. revelação, outro sistema?
	PGM	+++	+++	++/+	++/+	+++	✓	–/+	MTT, electroforese, outro sistema?
	PGD	+++	+	++	++	+++	✗	+	Outro sistema?

Tabela 5.3 — Panorama das actividades enzimáticas que, em cada sistema de separação (Separ.), podem ser visualizadas. Consideram-se confirmadas aquelas que foram consistentes e apresentavam alguma forma de polimorfismo, intra-específico ou interespecífico; prováveis, aquelas que preliminarmente deram sinais de poderem ser utilizadas na discriminação entre as espécies, incluindo híbridos; transpostas, as que confirmadas num sistema de separação podem ser exploradas noutro sistema; outras, as que foram reveladas uma única vez, sem haver confirmação dos polimorfismos que tenham surgido (entre parêntesis, as que o foram várias vezes, sempre monomórficas entre e dentro de espécies). Um s minúsculo antes da sigla da actividade enzimática refere resultados só disponíveis em sementes.

Separ.	Confirmadas	Prováveis	Transpostas	Outras
C	DIA MDH PER	EST		ACP ADH TYR
R	PGI EST SOD	sGDH	PER GsR	EST-F (G2D CAT LAP)
H	GsR PGM PGD SKD		SOD PER sDIA sGDH sMDH	
9		ACP-F	CAT	ALD EST-F GPT PGK sAAT sEST
4		IDH PER	DIA MDH PGD GsR	ADH
M				SKD

Conclusões

O estatuto híbrido dos cerqueiros foi verificado com base em marcadores genéticos (isoenzimáticos), deste modo contribuindo para estabelecer estes marcadores como meios eficazes de detecção do hibridismo entre sobreiro e azinheira. O facto desta abordagem poder fazer-se em material foliar retira limitações quanto à idade das plantas ou à época do ano.

A dedução da hereditariedade para os isoenzimas discriminantes, embora com algumas limitações, permitiu identificar a origem do pólen interveniente na produção das descendências de 3 híbridos, assim se verificando que são férteis com pólen de sobreiro, de azinheira, e *self*, este numa proporção aparentemente muito elevada para o que se deve esperar nestes *Quercus*.

Apesar da ineficiência, inerente a serem ainda poucos marcadores genéticos, para verificar a suposição que os sobreiros de cortiça preguenta são introgrididos com genes de azinheira, a demonstração da fertilidade dos híbridos com pólen de sobreiro, como necessário ponto de partida para essa introgressão, a par dos resultados obtidos com uma limitada amostragem realizada nesses sobreiros, favorecem-na.

A ausência de híbridos nas descendências de sobreiros e azinheiras em parcelas mistas apenas permitiu calcular um majorante da incidência de híbridos de valor muito baixo. A biologia da reprodução das duas espécies, evidenciada pelo estudo intra-específico de marcadores polimórficos, leva a postular que, à proximidade topográfica entre indivíduos das duas espécies, *a priori* um factor relevante para o hibridismo, deve associar-se a proximidade fenológica das respectivas florações e a sua compatibilidade na reprodução. Por isso a incidência de hibridismo será em geral muito baixa, devendo esperar-se que se focalize onde durante vários anos se conjugam esses factores. A frequência com que se diz ocorrerem “negrais” no Alentejo não é compatível com as estimativas feitas, pelo que deve supor-se que esta designação não se identifica com os verdadeiros híbridos.

O presente estudo permite encarar várias linhas de investigação onde os marcadores enzimáticos utilizados em larga escala no presente estudo, assim como outros que entretanto se demonstrem igualmente úteis, podem desempenhar um papel relevante. São especialmente interdependentes a verificação da incidência de hibridismo em

povoamentos mistos, com base numa amostragem de vários anos e abrangendo várias proveniências, o estudo da biologia da reprodução dos híbridos, e o do desenvolvimento do ritidoma dos seus descendentes. Os marcadores isoenzimáticos também podem ser de grande utilidade na investigação de possível introgressão nos sobreiros de cortiça preguenta e dos “negrais”.