

Glossário

A — Siglas

1) Métodos e conceitos de Biologia Molecular

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*): polimorfismo do tamanho dos fragmentos (de DNA) obtidos por amplificação, com *primers* arbitrários, seguida de hidrólise com enzimas de restrição padrão (arbitrários em relação ao genoma que é sondado). Distingue-se dos PCR-RFLPs porque nestes os *primers* não são arbitrários e os enzimas de restrição são desenhados expressamente para as sequências amplificadas.

cpDNA, mtDNA, rDNA: componentes do DNA duma célula que correspondem, respectivamente, ao cromossoma plastidial, ao cromossoma mitocondrial e ao que é transcrito para produzir o RNA dos ribossomas (região organizadora do nucléolo).

ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*): caso especial de RAPD em que os *primers* são semi-arbitrários (complementares a SSRs).

ITS (*Internal Transcribed Spacer*): segmentos intermédios, dos *loci* rDNA que são transcritos em RNA 45S, abrangendo desde o final do segmento 18S até ao início do segmento 5,8S (ITS1) e do final do segmento 5,8S até ao início do segmento 26S (ITS2).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): reacção em cadeia catalisada por uma polimerase, que permite a amplificação, em progressão exponencial, duma sequência nucleotídica delimitada por dois *primers*. É frequente ser combinado com outras metodologias, por exemplo PCR-RFLP (cf. RFLP).

Primer: oligonucleótido de iniciação para reacções catalisadas por polimerases de DNA. No contexto da PCR, permite seleccionar as sequências-alvo a serem amplificadas.

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*): DNA polimórfico obtido por amplificação (usando PCR) a partir de *primers* arbitrários.

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*): polimorfismo do tamanho dos fragmentos (de DNA) obtidos por hidrólise com enzimas de restrição. PCR-RFLP especifica que o DNA hidrolisado são sequências de DNA amplificadas por PCR, mas as especificações dos *primers* e dos enzimas distinguem-no de AFLP.

SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*): segmentos cromossómicos polimórficos seleccionados entre uma colecção de RAPDs

e para os quais se passa a fazer a amplificação com *primers* expressamente desenhados.

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*): polimorfismo devido a mutação pontual (substituição dum par nucleotídico do DNA por outro, assim alterando a sequência de bases nucleotídicas numa das posições).

SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*): polimorfismo de conformação, por emparelhamento intramolecular numa cadeia simples de DNA, evidenciado através de diferenças de migração por electroforese num gel de poliacrilamida.

SSR (*Simple Sequence Repeat*): repetição de sequência simples, também conhecido como *micro-satélite*, localizada ou num cromossoma do núcleo (nSSR) ou no dos plastos (cpSSR).

2) Conceitos e parâmetros de Genética das Populações

H_e : proporção esperada de heterozigóticos num *locus*, de acordo com a distribuição de Hardy-Weinberg de frequências genotípicas.

A_e/v : número efectivo de alelos/diversidade do fundo genético, serve como medida do grau de polimorfismo num *locus* (matematicamente, é o inverso de $1 - H_e$).

V (ou v_{gam}): diversidade gamética hipotética, medida para o número potencial de genótipos diferentes, na fase gamética.

F : coeficiente de fixação, que pode ser entendido como medida do desvio das frequências dos heterozigóticos em relação a H_e , ou como medida da correlação genética entre dois gâmetas tirados ao acaso numa população. De ambas as maneiras, o valor pode ser positivo ou negativo, em função dum défice ou excesso, respectivamente, de heterozigóticos. Define-se, complementarmente, um *índice panmítico* $P = 1 - F$.

N_e : tamanho efectivo numa população real, corresponde ao tamanho numa população “ideal” (que, aparte ser finita, é a do modelo de Hardy-Weinberg) com o mesmo valor do coeficiente de fixação F .

F_{IT} : valor da correlação genética entre os gâmetas produzidos pelos indivíduos (I) da população total (T), ou seja, coeficiente de fixação para a população como um todo.

F_{IS} : valor da correlação genética entre os gâmetas produzidos pelos indivíduos (I) numa subpopulação (S), ou seja, coeficiente de fixação para cada subpopulação dentro da população. Se não houver subdivisão de cada subpopulação, F_{IS} é inversamente proporcional ao N_e nas subpopulações.

F_{ST} : componente de F_{IT} devida à divergência entre subpopulações, por sua vez resultante da deriva genética em cada uma delas (N_e finito).

Enquanto $P_{IS} = 1 - F_{IS}$ representa o decréscimo do índice panmíctico da população devido ao N_e finito das subpopulações, o valor de $P_{IT} = 1 - F_{IT}$ também depende, segundo o diagrama de caminhos (*paths*) $I \rightarrow S \rightarrow T$ (e assumindo independência entre os troços do caminho), do valor $P_{ST} = 1 - F_{ST}$, tal que $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$.

G_{ST} , δ : medidas de divergência entre populações, análogas a F_{ST} mas baseadas apenas nas frequências dos genes.

Bottleneck: efeito de gargalo, constrição temporária à transmissão da diversidade genética existente por redução do N_e ; essa redução traduz-se numa maior incidência da deriva genética, donde se produz uma divergência das frequências genéticas duma população para as outras, sem implicar pressões selectivas, que persiste mesmo após a recuperação de valores de N_e mais elevados e até com fluxos genéticos uniformizadores.

m : taxa de migração, ou proporção de genes no fundo genético duma população que são substituídos pelos provenientes doutras populações. Quando o fluxo genético entre duas populações é bidireccional, as frequências genéticas em ambas convergem entre si.

Φ_{FT} : medida análoga a F_{ST} , baseada na divergência entre famílias (F) em relação à população total (T): em particular no caso de árvores, é uma medida da divergência entre as subpopulações de gâmetas masculinos, agrupadas por família materna, que as antecederam.

I ou índice de Moran: medida de autocorrelação espacial, para definição da tendência de agrupamento topográfico de indivíduos aparentados geneticamente.

Fitness: valor normalizado da contribuição dum determinado genótipo, através dos gâmetas que produz, para o fundo genético da população. A sua tradução literal, *adaptação*, constitui um dos factores determinantes do *fitness*. O conceito de *fitness*, assim definido para indivíduos e para a reprodução sexuada, também é usado, com sentido análogo, para populações e/ou para clones.

Hitch-hike: propagação dos efeitos de processos evolutivos (geralmente selecção), sobre um gene, aos genes que com ele têm a possibilidade de recombinação limitada (nomeadamente por ligação cromossómica bastante próxima).

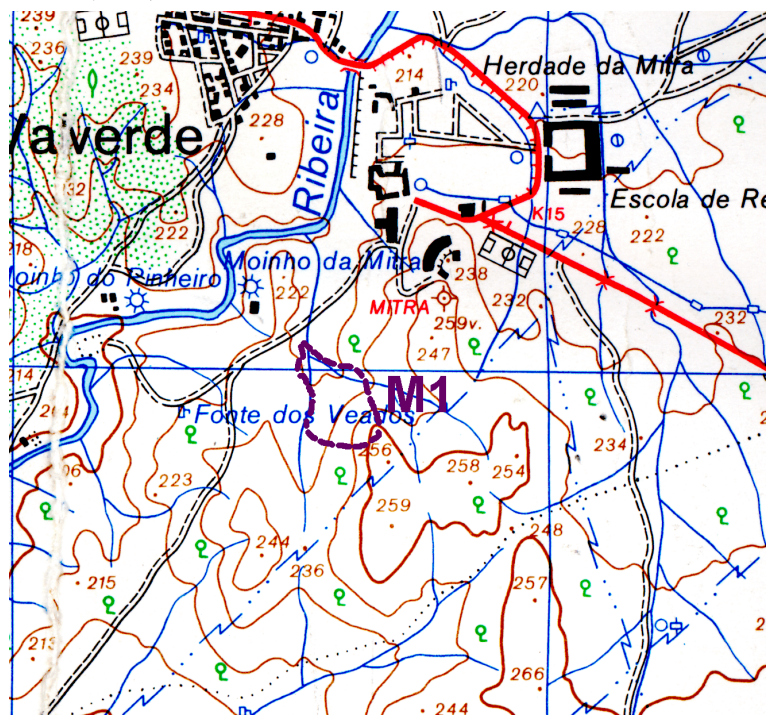
Apêndice I: mapas e fotos

A — Cartas militares

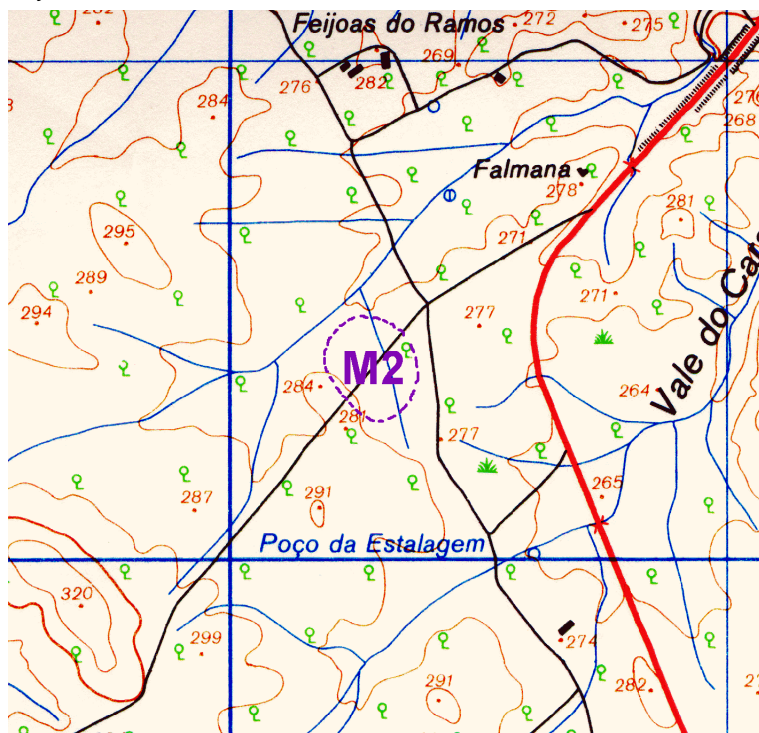
Nesta secção apresentam-se as localizações aproximadas dos povoaamentos e indivíduos estudados, sobre a área relevante da respectiva carta militar (1:25000 no original).

1) Povoaamentos mistos

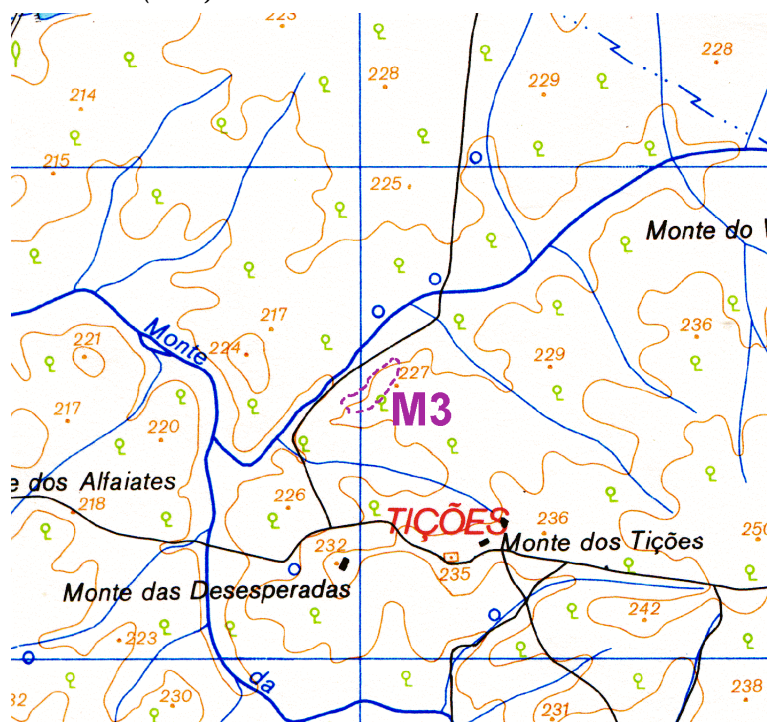
Mitra (M1) — carta 459



Feijoas do Ramos (M2) — carta 480

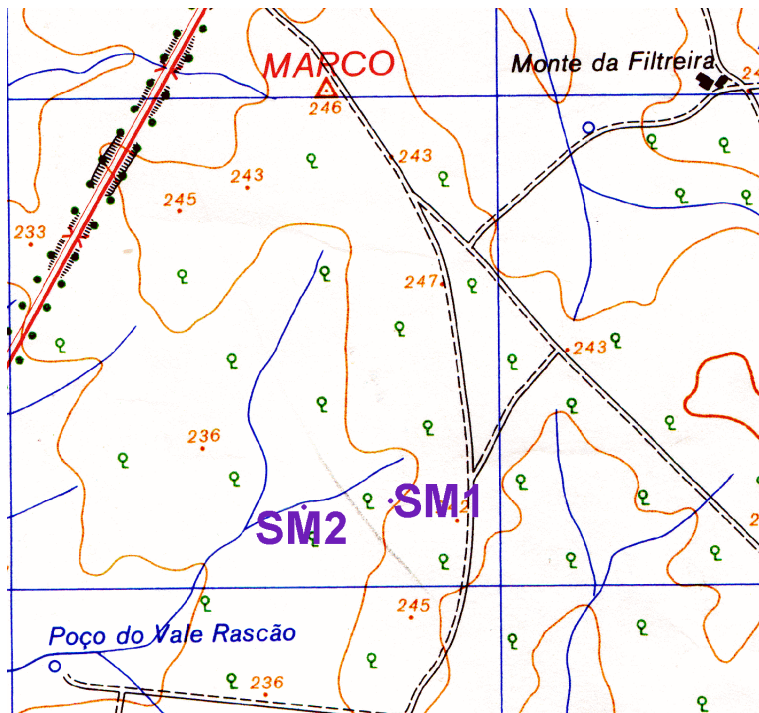


Alfaiates (M3) — carta 489

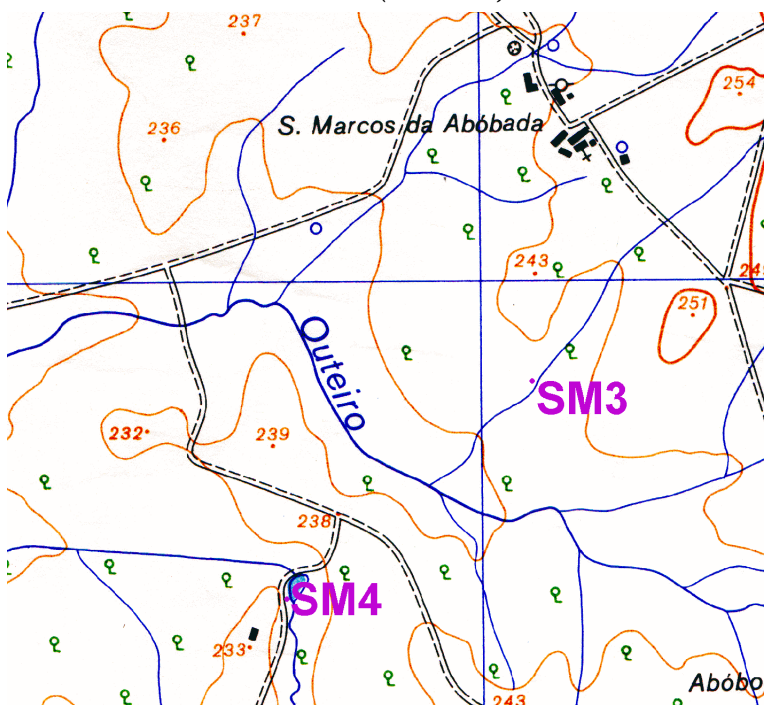


2) Híbridos

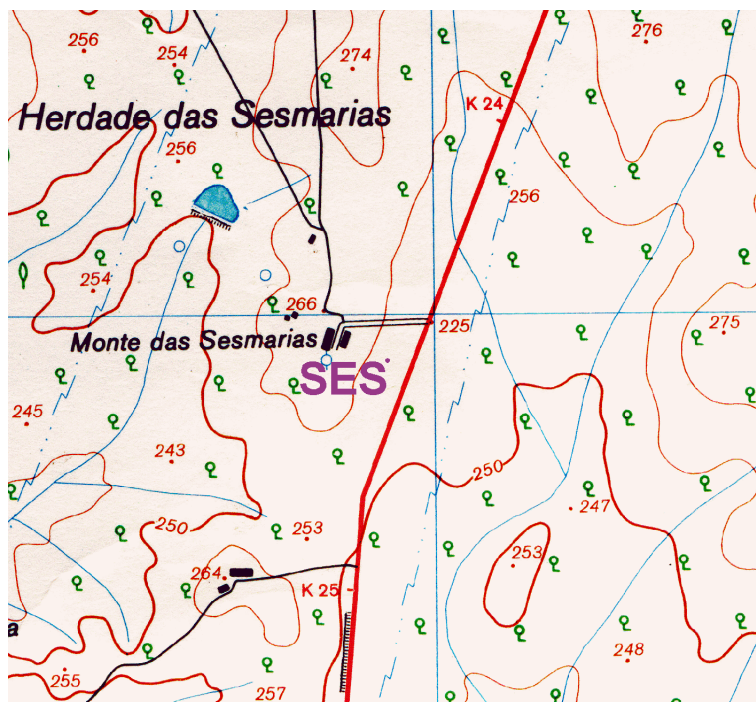
Outeiro (SM1–2) — carta 471



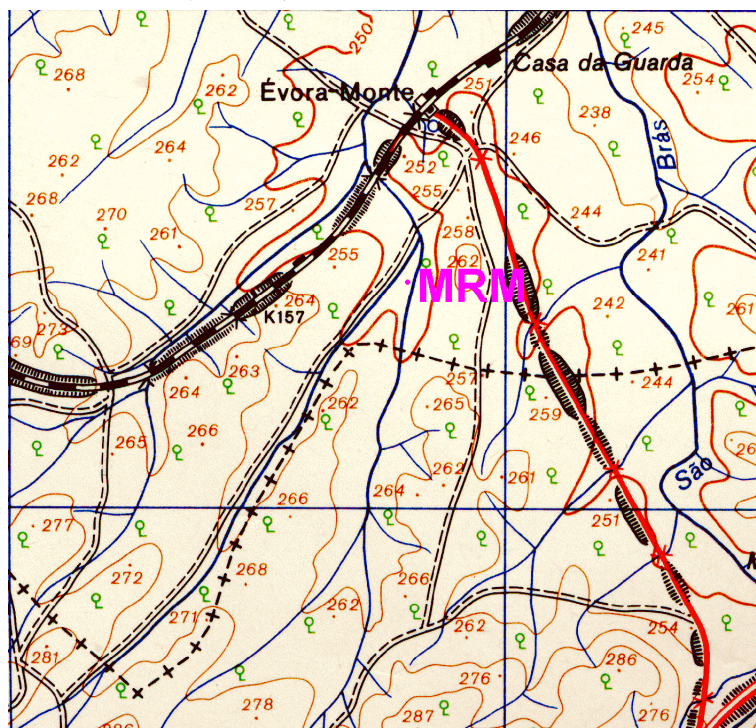
São Marcos da Abóbada (SM3–4) — carta 471



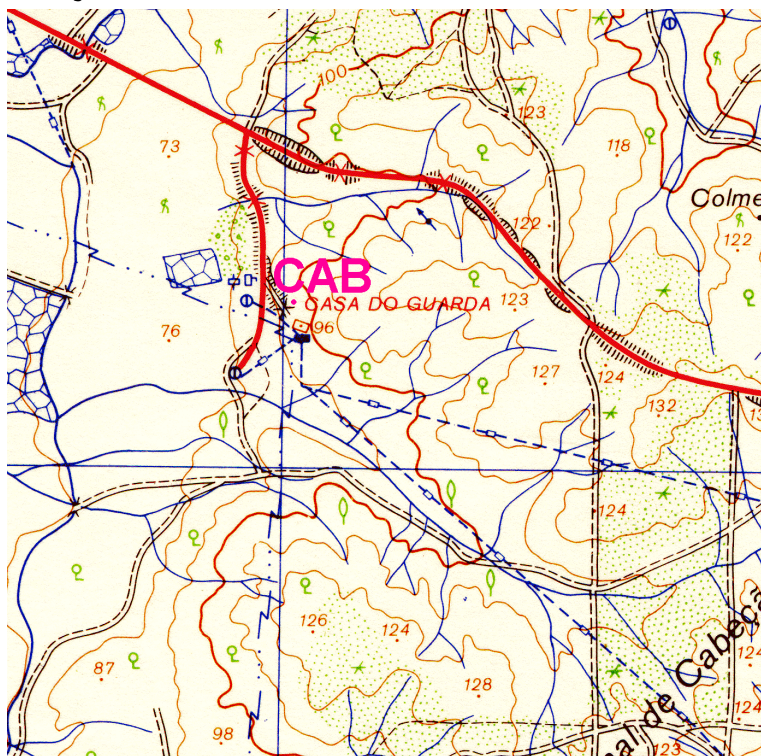
Sesmarias (SES) — carta 488



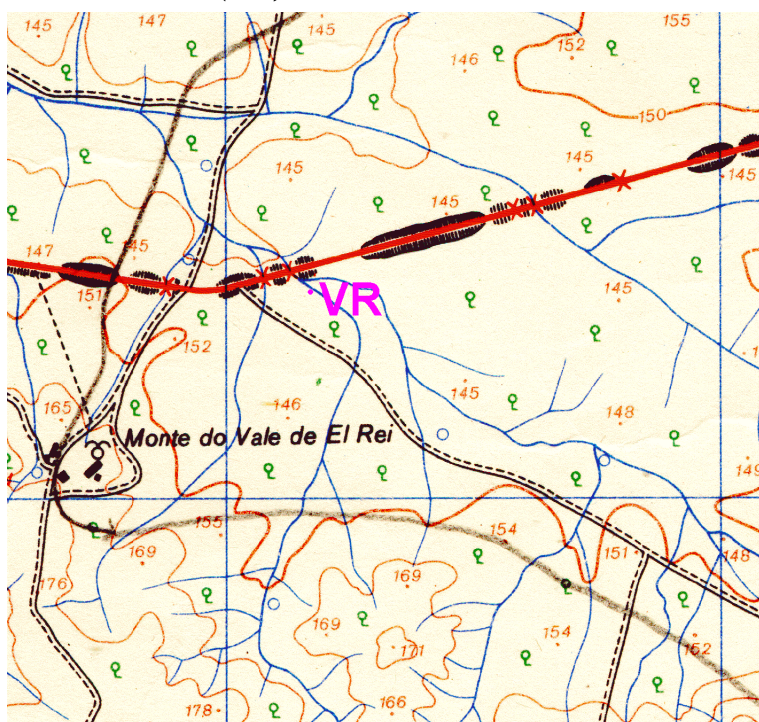
Marmeleira (MRM) — carta 425



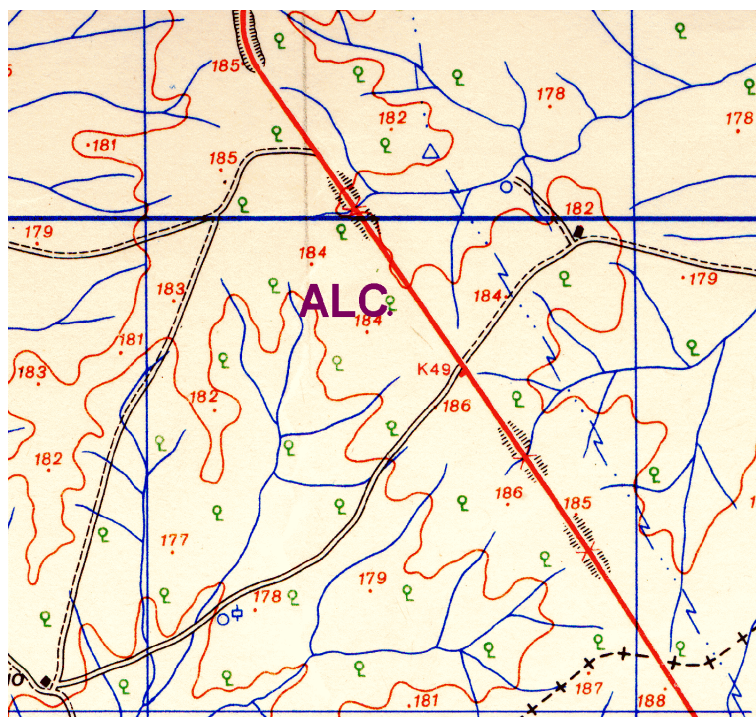
Cabeção (CAB) — carta 395



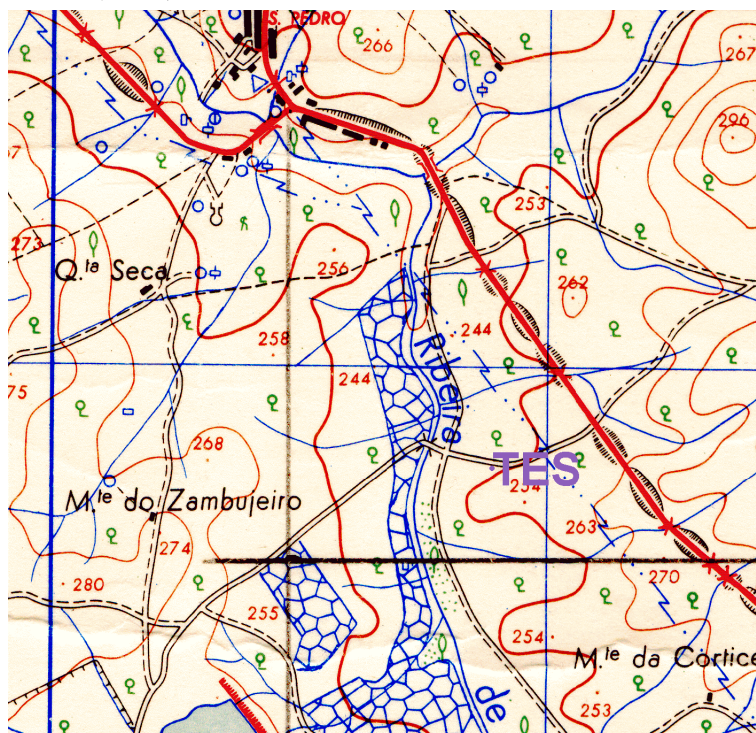
Vale de El-Rei (VR) — carta 409



Alcarou de Baixo (ALC) — carta 423



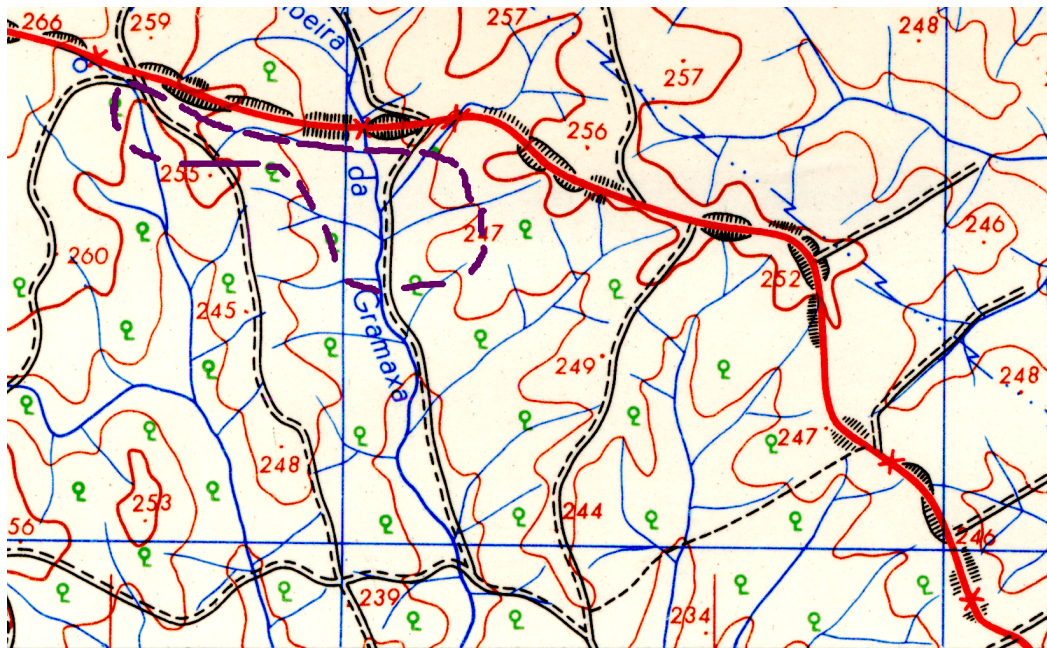
Testos (TES) — carta 437



3) Sobreiros de cortiça preguenta

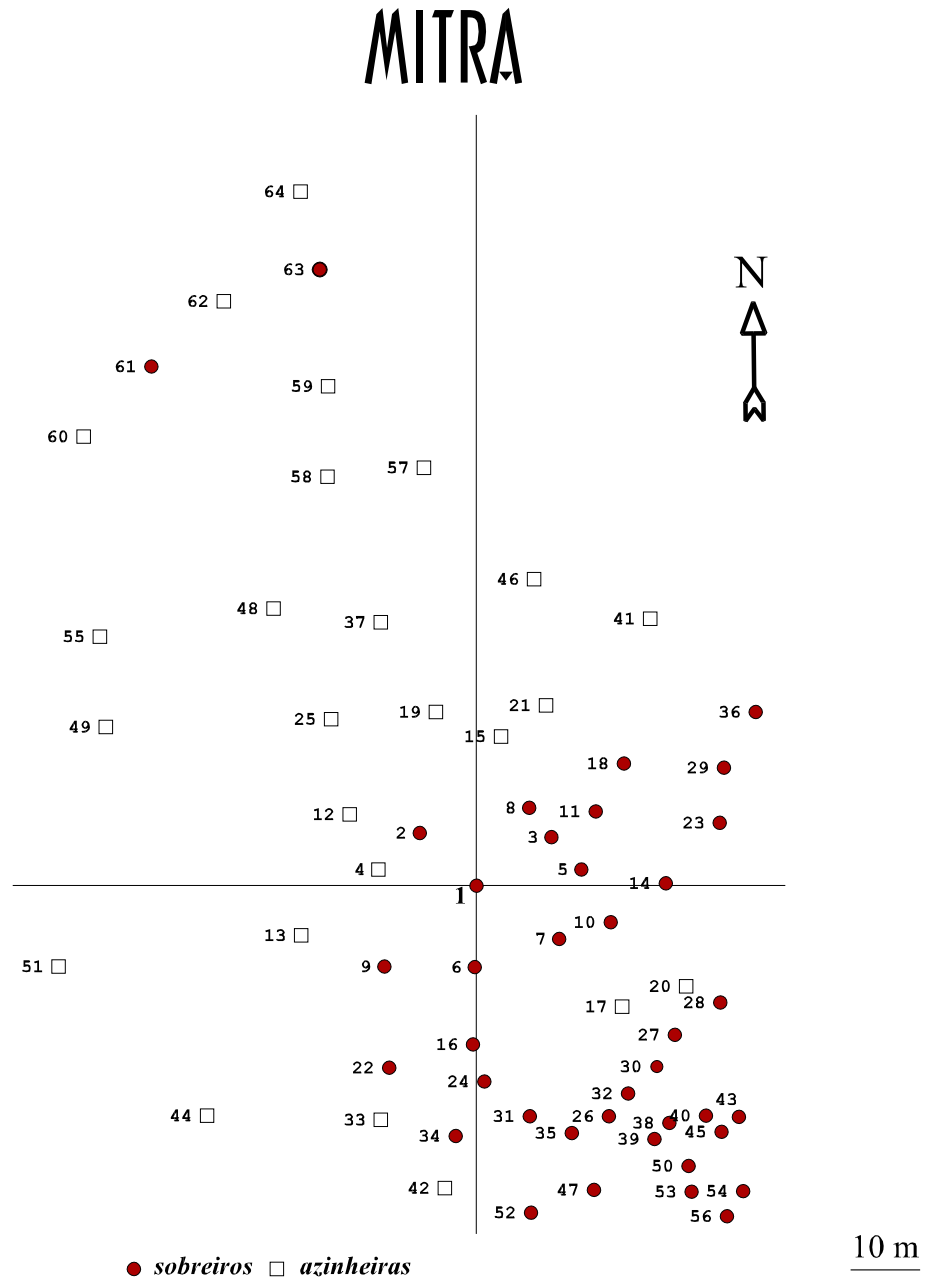
Apenas se indica a da Herdade de Montinho, Nossa Senhora de Machede

Montinho — carta 449



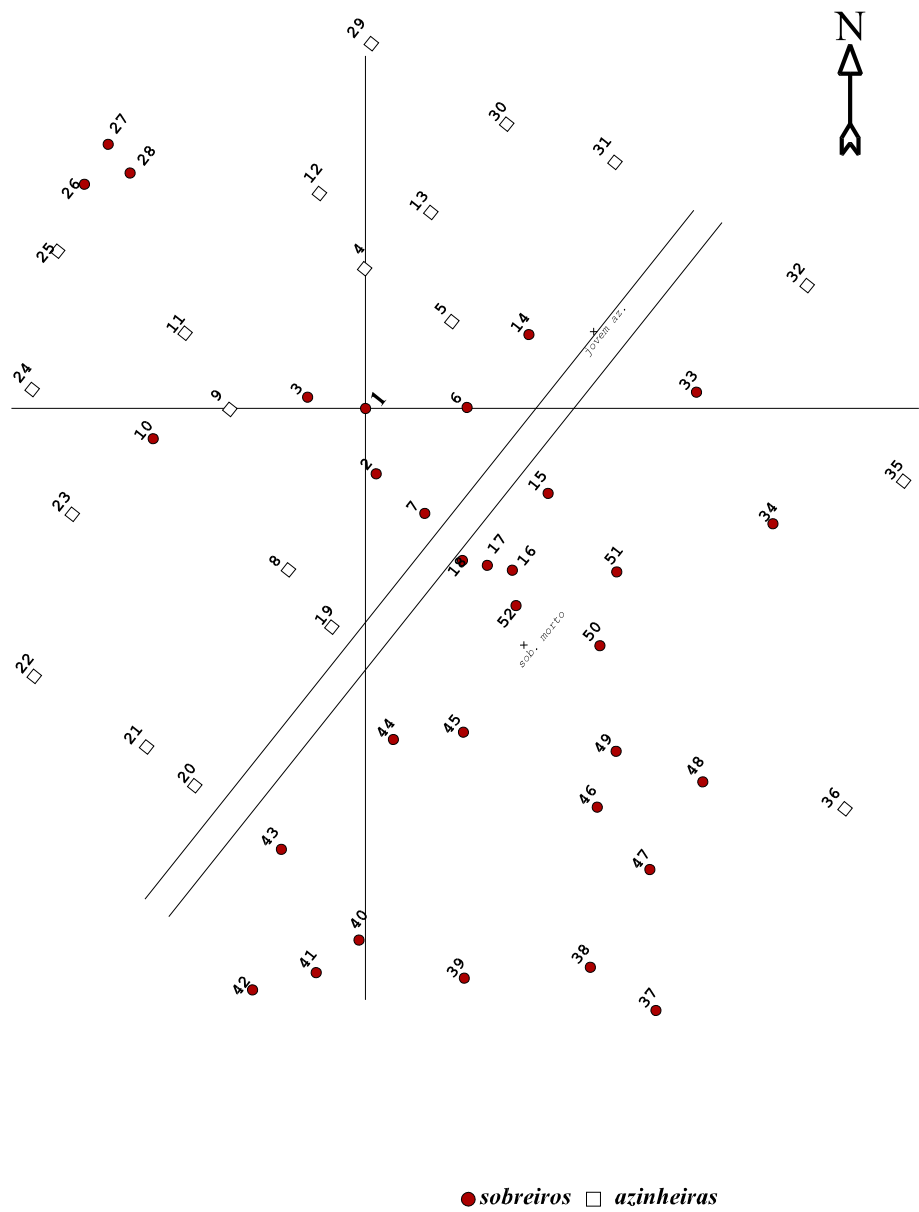
B — Topografia aproximada das árvores marcadas

1) Mitra



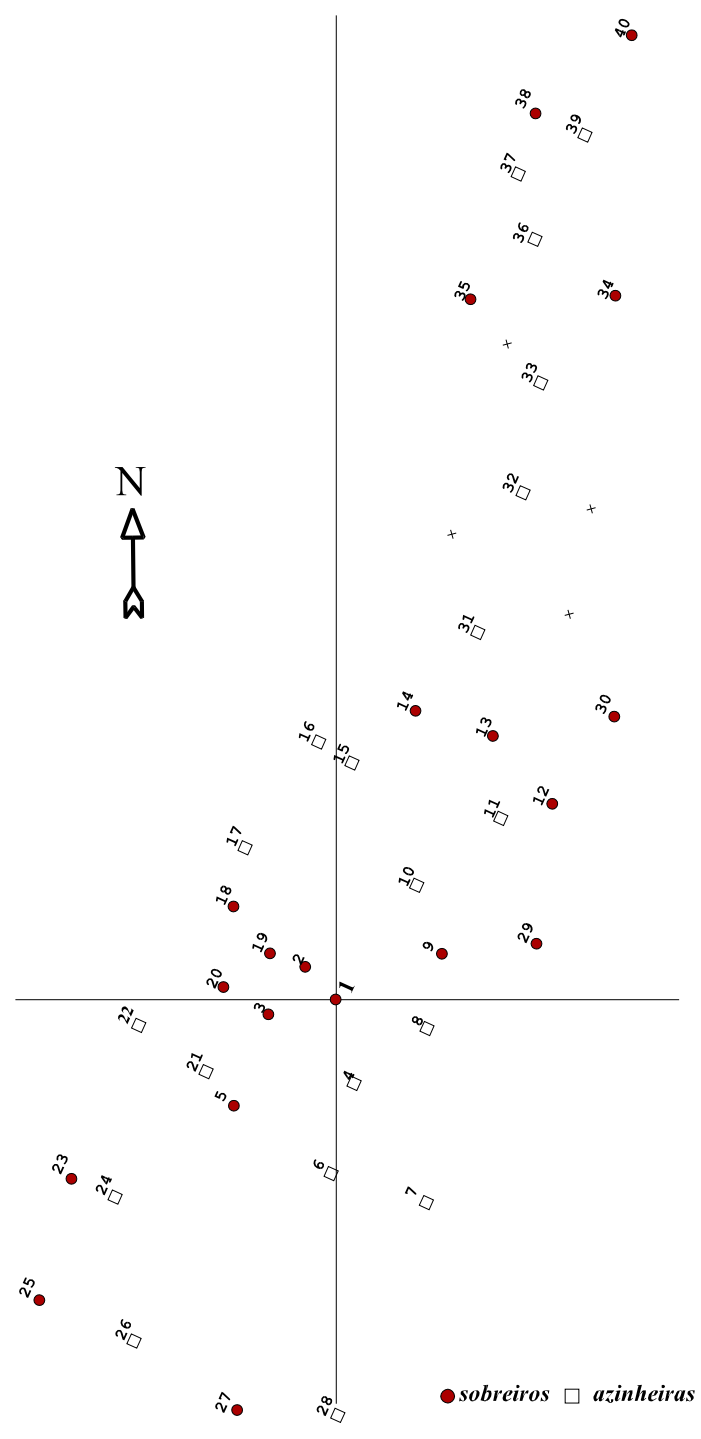
2) Feijoas

Feijoas do Ramos

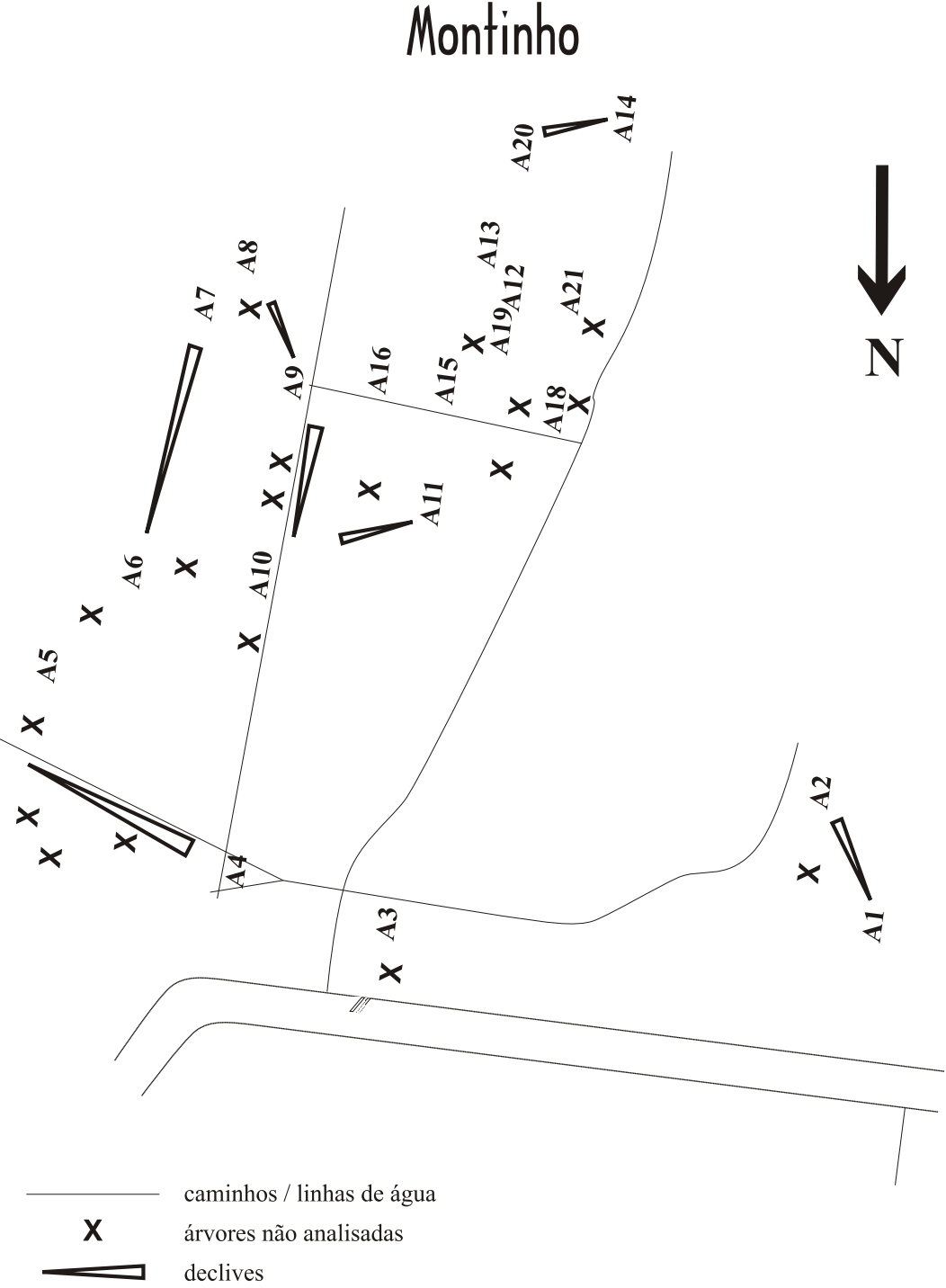


3) Alfaiates

Alfaiates



4) Montinho



C — Fotografias

1) Plantas jovens



Azinheiras



Sobreiros

2) Híbridos



SM1



SM2



SM3



SM4 e seu enquadramento



SES



MRM



ALC



CAB



VR



TES

3) Entrecasco (Montinho)



Entrecasco normal



Entrecasco pregunto

Apêndice II: estudos diversos

A — Filogenia dos *Quercus*, simplificada

Baseada na figura 4 de Manos *et al.* [2001], com remoção das hierarquias não-significativas e restrita ao gênero *Quercus*, a figura 6.1 representa o parentesco provável, baseado em sequências do DNA, entre diversas espécies mencionadas no presente trabalho.

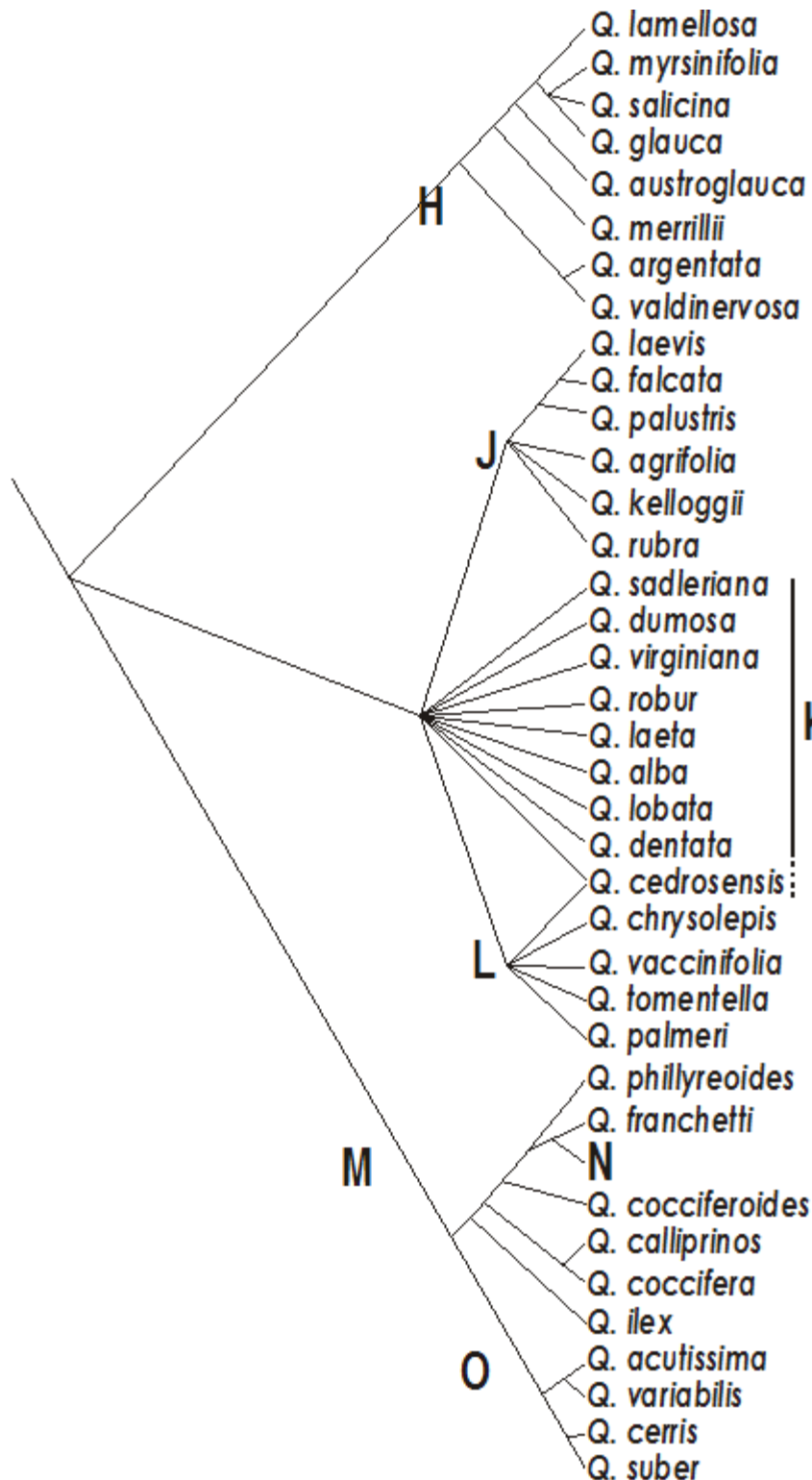


Figura 6.1 — Topologia filogenética do gênero *Quercus* (dendrograma de consenso estrito) [Manos *et al.* 2001]. O grupo de referência (*outgroup*) mais próximo é o que inclui *Castanea* (figura 2.2). A extensão de cada segmento não representa quantitativamente a distância entre os táxones. As letras designam alguns clades: H — subgênero *Cyclobalanopsis* (os restantes clades, J–K–L–M, constituem o subgênero *Quercus*, parafilético neste esquema); J — seção *Lobatae*; K — seção *Quercus* s.s.; L — seção *Protobalanus* (espécies não resolvidas); M — seção *Cerris*; N — subseção *Brachylipides* (que inclui *Q. pseudosemicarpifolia*, *Q. senescens*, *Q. rhoderiana*, *Q. guajavifolia*, *Q. longispica*, *Q. angleriana*, *Q. spinosa*, *Q. monimotricha* e *Q. pannosa*); O — subseção *Cerris*. Não se incluem os autores adotados para cada táxone, que podem ser consultados no apêndice do original.

B — Proporção de substituições de aminoácidos com mudança de carga eléctrica

Os aminoácidos com carga eléctrica são R, K e H (carga positiva), e D e E (carga negativa). Qualquer substituição envolvendo perda, ganho ou inversão de carga eléctrica terá de envolver um destes, e são principalmente essas substituições as que são detectáveis nas electroforeses em amido. Há 162 substituições desse tipo (43% num total de 380), sendo em número de 12 as que produzem uma inversão de carga e têm por isso o dobro do efeito na migração através do gel.

As matrizes BLOSUM permitem estimar a probabilidade q_{ij}/e_{ij} de substituição dum aminoácido i por um aminoácido j , cada matriz respeitando a uma determinada percentagem de homologia entre proteínas (isto é, diferentes graus de divergência filogenética). Como cada elemento s_{ij} da matriz é $2\log_2(q_{ij}/e_{ij})$, obtêm-se os valores das probabilidades pela operação inversa, ou seja,

$$\frac{q_{ij}}{e_{ij}} = 2^{s_{ij}/2}$$

Para calcular a proporção de substituições com alteração da carga, obtiveram-se as médias harmónicas dos quocientes q_{ij}/e_{ij} para o conjunto de todas as substituições e para as que envolvem alteração de carga, multiplicadas pelas respectivas frequências (tabela 6.1)

Tabela 6.1 — Estimativa da proporção de substituições que envolvem mudança de carga. Note-se que o facto duma substituição implicar mudança de carga torna-a apenas um pouco menos provável (B) do que para as substituições em geral (A). A matriz BLOSUM 62 refere-se a blocos de sequências de aminoácidos homólogos a pelo menos 62%, a BLOSUM 90 idem a 90%, e a BLOSUM 100 a sequências idênticas.

	BLOSUM 62	BLOSUM 90	BLOSUM 100
q_{ij}/e_{ij} global = A	0,5401	0,3744	0,1593
q_{ij}/e_{ij} mudança de carga = B	0,5158	0,3457	0,1405
162B/380A	40,7%	39,4%	37,6%

Os cálculos resumidos na tabela 6.1 sugerem que a probabilidade se encontra próximo dos 40%, ligeiramente menos se se tratar de tempos de divergência muito recentes.

Fonte utilizada para as matrizes:

<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/matrices/>

Referência adicional:

<http://helix.biology.mcmaster.ca/721/distance/node10.html>

C — Coeficiente de fixação esperado (F_{esp} , tabela 4.32)

Considerando um *locus* de n alelos, definem-se 3 distribuições de frequência para os gametas femininos ($x'_1, x'_2, \dots, x'_n$), masculinos ($X_1, X_2, \dots, X_n$) e diplóides deles resultantes ($x_1, x_2, \dots, x_n$).

Em panmixia, $x_i = \frac{1}{2} (x'_i + X_i)$, de modo que pode definir-se $\Delta x_i = X_i - x_i = - (x'_i - x_i)$.

A proporção de homozigóticos resultantes da conjugação é $1 - H_e = \sum_i x'_i X_i = \sum_i (x_i - \Delta x_i)(x_i + \Delta x_i) = \sum_i (x_i)^2 - \sum_i (\Delta x_i)^2$. Notando que existe um desvio $\sum_i (\Delta x_i)^2$ de sinal negativo em relação à expectativa de Hardy-Weinberg, o coeficiente de fixação a esperar F_{esp} é negativo, podendo calcular-se resolvendo a seguinte equação:

$$\sum_i (x_i)^2 - \sum_i (\Delta x_i)^2 = \sum_i (x_i)^2 + [\sum_i x_i(1 - x_i)]F_{\text{esp}},$$

donde

$$F_{\text{esp}} = - \frac{\sum_{i=1}^n (\Delta x_i)^2}{\sum_{i=1}^n x_i(1 - x_i)}$$

D — Simulação das linhagens derivadas dos híbridos

Considere-se um híbrido entre sobreiro e azinheira, F_1 , cuja fertilidade com pólen de sobreiro, azinheira e de F_1 (incluindo ser autopolinizado) se traduz numa distribuição na descendência (F_2) de pS_1 retrocruzados com sobreiro (linhagem XS), pA_1 retrocruzados com azinheira (linhagem XA), e pX_1 com F_1 (incluindo *selfing*, linhagem XX), $pS_1 + pA_1 + pX_1 = 1$.

Os indivíduos XS contêm *em média* 75% de genoma nuclear de sobreiro e 25% do de azinheira. Assumindo que estas percentagens são iguais, respectivamente, a pS_2 e pA_2 (isto é, às probabilidades de produzirem descendência retrocruzando com sobreiro ou azinheira), e que $pX_2 \approx 0$ (assumindo que a fertilidade com pólen de F_1 é desprezável quando o conteúdo médio em genoma de sobreiro ou azinheira é diferente de 50%), então resultam na F_3 desta linhagem 75% de

indivíduos XSS e 25% XSA, com 87,5% e 37,5% de genoma nuclear de sobreiro, respectivamente. Usando raciocínio análogo deduzem-se, na F_3 descendente dos XA, 75% XAA com 37,5% em média de genoma nuclear de sobreiro e 25% com 87,5%. No caso dos XX, assume-se $pS_2 = pS_1$, $pA_2 = pA_1$ e $pX_2 = pX_1$.

Se se considerar que todas as linhagens são igualmente férteis, produz-se na geração F_n um número 2^{n-2} de combinações diferentes nas linhagens dos XS, idem nas dos XA, e $2^{n-1}-1$ nas linhagens dos XX. Por exemplo na F_4 , e considerando $pS_1 = pA_1 = \frac{1}{2}(1 - pX_1)$, $pX_1 = 10\%$ (cf. tabela 4.18) a distribuição de linhagens é a seguinte:

linhagem	XSSS	XSSA	XSAS	XSAA	XASS	XASA	XAAS	XAAA	XXSS	XXSA	XXAS	XXAA	XXXS	XXXA	XXXX
% genoma Sb	93,8	43,8	68,8	18,8	81,3	31,3	56,3	6,3	87,5	37,5	62,5	12,5	75,0	25,0	50,0
frequência (%)	29,5	4,2	4,2	7,0	7,0	4,2	4,2	29,5	3,4	1,1	1,1	3,4	0,5	0,5	0,1

Nota-se que as linhagens mais frequentes são também as que contêm os valores mais extremos de percentagem de genoma de sobreiro. A distribuição na F_5 é ilustrada na figura 6.2.

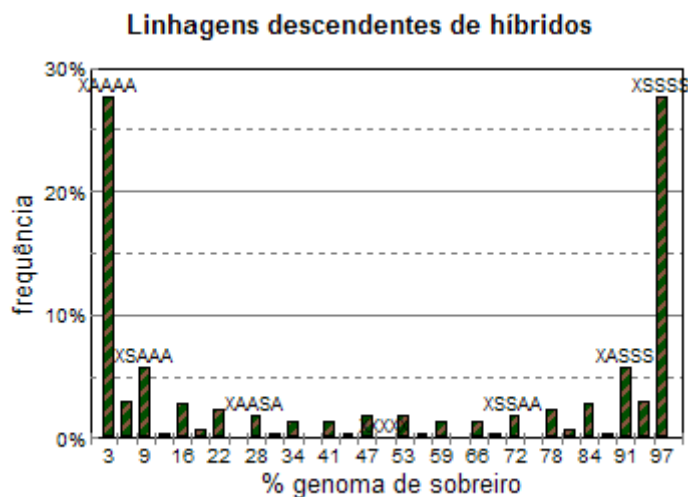


Figura 6.2 — Resultados da simulação na F_5 , conforme o modelo que é exposto no texto.

É natural que, pela variação do conteúdo em genoma nuclear de sobreiro dentro de cada linhagem, uma proporção das classes extremas inclua azinheiras e sobreiros “puros”, mas a questão que mais deve interessar no contexto do presente estudo é: quantas gerações são necessárias para aparecerem “azinheiras” e “sobreiros” a partir duma F_1 ? Na figura 6.3 responde-se para diferentes valores arbitrários de percentagem de genoma nuclear de sobreiro.

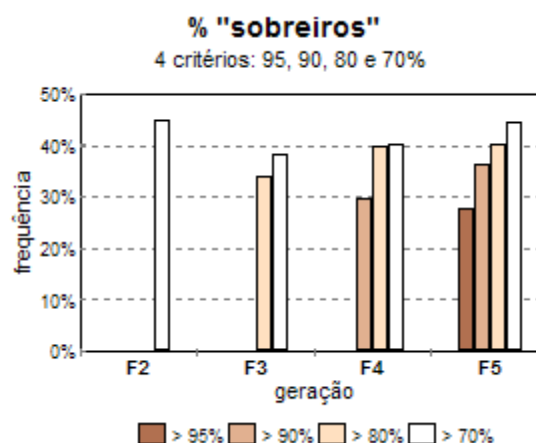


Figura 6.3 — Frequência de indivíduos com uma percentagem de genoma de sobreiro superior a um determinado critério arbitrário de definição do que é aparentemente “sobreiro”. Note-se que, pela simetria das distribuições (cf. figura 6.2), o resultado é idêntico para a frequência de “azinheiras”.

E — Estudos sobre o pólen dos híbridos

1) Fenologia da floração

Durante a época de floração de 2003, foi feito o acompanhamento da floração das seguintes árvores:

Sobreiros (de floração precoce): M01, M09, M14, M27, M32, M35, M40, M50, M61

Azinheiras (de floração tardia): M55, M60, M64; (precoce): M04, M15, M41, M51, M58

Híbridos: ALC, CAB, MRM, SES, SM1, SM2, SM4, TES, VR

TES refere-se à Herdade de Testos, São Pedro da Gafanhoeira (Arraiolos), uma árvore jovem de casca fina, localizada à latitude 38°44.1'N e longitude 8°04.0'W (Apêndice I, secção A2). Não existe confirmação por marcadores isoenzimáticos se se trata de facto dum híbrido, mas os caracteres morfológicos são totalmente concordantes (cf. “Revisão bibliográfica” parte III, secção C).

Na tabela 6.2 apresentam-se as observações realizadas, e na figura 6.4 um resumo das datas médias de passagem por cada fase em cada grupo, excepto para o caso duma azinheira excepcionalmente tardia, M64. Os híbridos situam-se quase equidistantemente entre as azinheiras tardias (II) e os sobreiros precoces, mas individualmente há também uma grande dispersão, nomeadamente com a precocidade de SES. É de supor que a floração masculina de TES e VR a atingir a fase F₂ tenha sido nula ou

quase.

Tabela 6.2 — Fases fenológicas (floração masculina) observadas em azinheiras, híbridos e sobreiros, durante a época de floração da Primavera de 2003 (4 de Abril a 16 de Maio). A subdivisão das azinheiras entre precoces e tardias foi feita *a priori*, com base em observações precedentes do projecto PAMAF 8153 em 1998 e 2000 [M. C. Varela, comunicação pessoal].

	Árvore	04-Abr	11-Abr	16-Abr	24-Abr	30-Abr	08-Mai	16-Mai
Az. pre- coces	M4	F	F/F ₂ /G	—	G	—	—	—
	M15	G?	G	—	G	—	—	—
	M41	F/F ₂	F/F ₂ /G	—	G	—	—	—
	M51	F ₂	F/F ₂	—	F ₂	—	—	—
	M58	F(F ₂)	(F)F ₂ /G	—	G	—	—	—
Az. tardias	M55	D	E	—	F/F ₂	—	G+	—
	M60	E	F	—	F ₂ /G	—	G+	—
	M64	nada	nada	—	C/D	—	F/F ₂	H?
Híbridos	SES	D/E	F	F/F ₂	(F ₂)G	—	—	—
	SM1	nada	(D/E)	C/D(E/F)	D/E(F)	—	(F /F ₂)	—
	SM2	C	D	D/E	E/F	—	(F/F ₂)G	—
	SM4	nada	—	—	—	—	F ₂ /G	—
	MRM	nada	—	D	—	E/F	—	G
	VR	nada	—	(D/E)	F	(F)	—	—
	CAB	C/D	—	F	F(F ₂)	F ₂	—	—
	ALC	nada		D	F	G		
	TES	C		E	F	(F)		
Sobreiros	M1	nada			E		F ₂	G
	M9	nada			E/F(F ₂)		F/F ₂	G
	M14	nada			E(F)		(F ₂)G	G
	M27	nada			D		F ₂ /G	G
	M32	nada			E/F(F ₂)		G	
	M35	nada			D		G	
	M40	nada			E		G	
	M50	nada			D		F(F ₂)	(F ₂)G
	M61	nada			E		F(F ₂)	F ₂

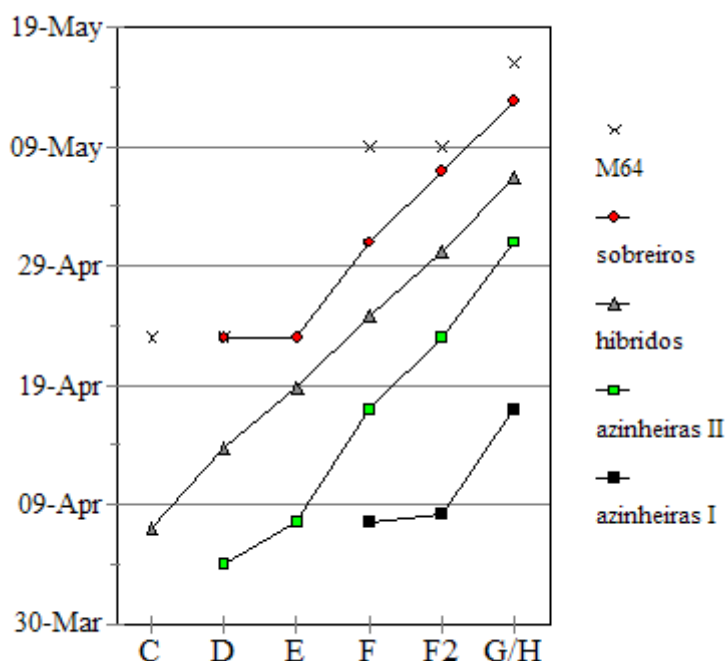


Figura 6.4 — Fenologia da floração, representada pelas datas médias de cada fase, calculadas entre os diferentes indivíduos de cada grupo considerado na tabela 6.2, excluída a M64 (azinheira II).

2) Dimensões do grãos de pólen de híbridos

Uma parte da amostragem mencionada na secção anterior serviu para recolher amostras de pólen com vista à determinação das dimensões dos grãos de pólen dos híbridos. Para tal, recolheram-se ramos amentíferos em fase Fm_2 (ou transitando de Fm para Fm_2), cuja haste era mergulhada dentro de recipientes com água, protegidos da agitação do ar, e após alguns dias o pólen sacudido sobre papel branco e recolhido dentro de tubos de 1,5 mL, mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posteriores manipulações [M. C. Varela, comunicação pessoal].

As preparações de grãos de pólen para microscopia seguiram um procedimento que é considerado em taxonomia particularmente adequado para medições rigorosas [Rodford *et al.* 1974].

Materiais utilizados

Glicerina gelatinada: embebição de 4 g de gelatina em pó com água fria dentro duma placa de Petri, primeiro espalhando o pó progressivamente sobre a água e depois mantendo durante a noite a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; transferência da papa compacta resultante para um gobelet para derreter em banho-maria a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, adicionando-se depois 6 mL de glicerol a 87% e 110 mg de fenol

(cristais), misturando-se, e filtrando-se através de gaze para um frasco escuro. A solução é guardada à temperatura ambiente, gelificada e protegida da luz, derretendo-se em banho-maria cada vez que fosse necessário. Verde de metilo e floxina B: soluções saturadas em etanol a 50%, mantidas em tubo de 1,5 mL à temperatura ambiente e protegidos da luz. Meio de montagem: 1 mL de glicerina gelatinada (derretida) com 50 μ L de verde de metilo e 40 μ L de floxina B.

Montagem das preparações

- i) Colocar uma pequena quantidade de pólen (não muito pequena!) no centro da lâmina;
- ii) Juntar 1 gota de álcool a 70% e deixar evaporar parcialmente (repetir com mais gotas se necessário)
- iii) Limpar anel de óleos eluídos em algodão embebido em álcool
- iv) Adicionar 1 gota (30 a 40 μ L) de meio de montagem e mexer dentro dela o pólen (manter a lâmina quente!)
- v) Cobrir com a lamela e aquecer brevemente

As preparações estão boas para observar só ao fim de 3 dias, com a exina corada de verde esmeralda e o restante material de carmim (figura 6.5).

Observação e medições

Os grãos de pólen dos *Quercus* são, na perspectiva polar, angulaperturados ou goniotremas, com um perfil equatorial triangular. Noutras perspectivas, o perfil é circular ou elíptico (figura 6.5). As medições fizeram-se sobre perfis de tipo circular ou elíptico, estes últimos no eixo menor. Prepararam-se 2 lâminas por indivíduo, medindo-se 30 grãos de pólen em cada uma com ampliação de 1000 $\times$ e ocular micrométrica calibrada, num microscópio Olympus BX50.

Também se notaram em todas as preparações o que parece serem restos de grãos de pólen apenas com a exina (corada de verde), sem conteúdo citoplásmico (figura 6.5 a). A percentagem de grãos de pólen “íntactos” foi determinada num campo óptico de cada preparação, excepto na primeira de ALC por nesta haver tão pouco material disponível.

Resultados

A figura 6.5 ilustra a morfologia dos grãos de pólen de 3 híbridos.

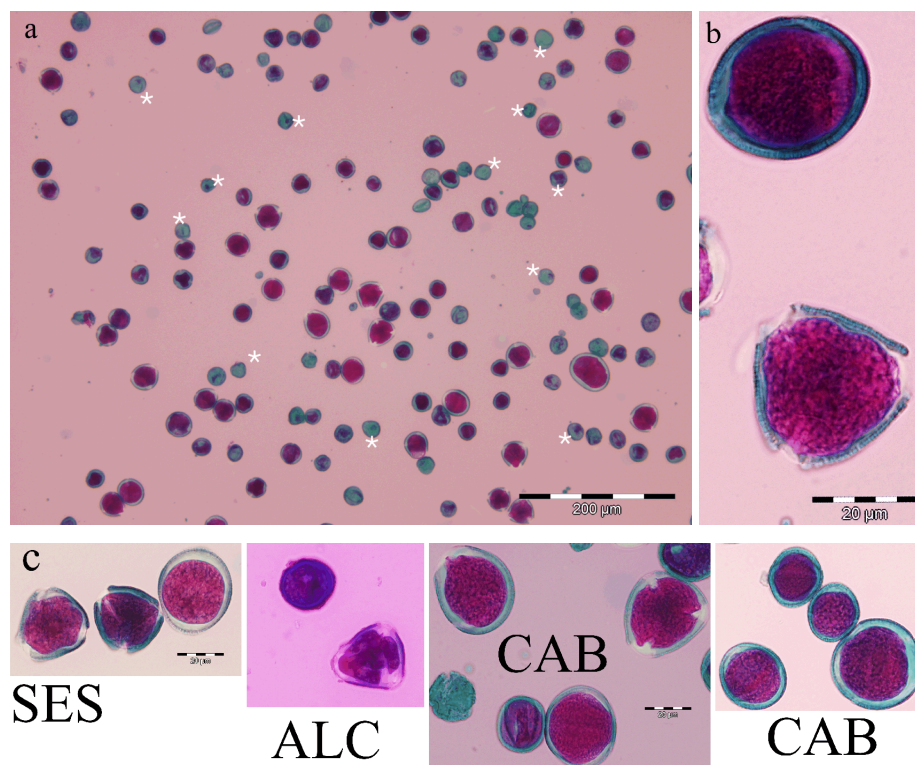


Figura 6.5 — Imagens de grãos de pólen de híbridos. a) Panorâmica duma preparação (de CAB), ampliação original 100×, observando-se várias figuras apenas com a coloração verde da exina (algumas são assinaladas com asteriscos). b) Dois exemplos (de SES), um em perspectiva equatorial com perfil elíptico, outro em perspectiva polar, ilustrando o perfil triangular, ampliação original 600× (imersão). c) Composição de imagens de diferentes preparações de SES, ALC e CAB, ampliação original 600× (imersão). Barras de calibração, 200 μm (a) e 20 μm (b, c). Fotos obtidas com câmara digital Olympus DP70 acoplada ao microscópio, com correcção de exposição e cor usando o *software* Olympus DP-Soft, versão 3.2, em ambiente Windows XP.

Na tabela 6.3 detalham-se as medições realizadas.

Tabela 6.3 — Estatísticas (valores mínimo e máximo, média, desvio-padrão da amostra) obtidas das medições feitas aos grãos de pólen de 2 sobreiros, 2 azinheiras e 3 híbridos. O valor de probabilidade (P) refere-se ao teste *t* de Student visando verificar se as médias nas duas preparações do mesmo pólen são heterogêneas (*, $P < 0,05$).

		sobreiros		azinheiras		híbridos		
		M09	M61	M51	M58	ALC	CAB	SES
Prep. 1	mín-máx.	22–36 μm	22–35 μm	21–25 μm	21–28 μm	18–31 μm	20–30 μm	20–32 μm
	média	27,4 μm	27,4 μm	23,5 μm	23,8 μm	24,5 μm	24,0 μm	25,4 μm
	desv.-p.	3,1 μm	3,7 μm	1,1 μm	1,8 μm	3,6 μm	2,6 μm	2,9 μm
Prep. 2	mín-máx.	24–34 μm	22–35 μm	19–26 μm	21–26 μm	19–30 μm	20–28 μm	20–35 μm
	média	28,9 μm	29,2 μm	23,3 μm	23,1 μm	22,6 μm	23,3 μm	25,9 μm
	desv.-p.	2,7 μm	2,9 μm	1,4 μm	1,5 μm	2,4 μm	1,8 μm	3,8 μm

	sobreiros		azinheiras		híbridos		
	M09	M61	M51	M58	ALC	CAB	SES
P	0,046 *	0,035*	0,474	0,099	0,025*	0,239	0,568
mín-máx.	22–36 μm	22–35 μm	19–26 μm	21–28 μm	18–31 μm	20–30 μm	20–35 μm
Média	28,1 μm	28,3 μm	23,4 μm	23,4 μm	23,6 μm	23,6 μm	25,6 μm
desv.-p.	3,0 μm	3,4 μm	1,2 μm	1,6 μm	3,2 μm	2,3 μm	3,3 μm

Através do teste t de comparação entre médias, verificou-se homogeneidade entre as amostras de sobreiro ($P = 0,75$), e entre as de azinheira ($P = 0,90$), e ainda entre ALC e CAB ($P = 0,90$), mas o valor médio de SES é heterogéneo em relação ao dos outros 2 híbridos (ANOVA simples, $F_{2;177} = 9,62$, $P = 0,01\%$). Conforme é já conhecido dos palinologistas [Brandão 1996], os grãos de pólen de azinheira são mais pequenos que os de sobreiro, e também de dimensões mais homogêneas, e os dos híbridos assemelham-se mais aos de azinheira, embora com maior variação (figura 6.6).

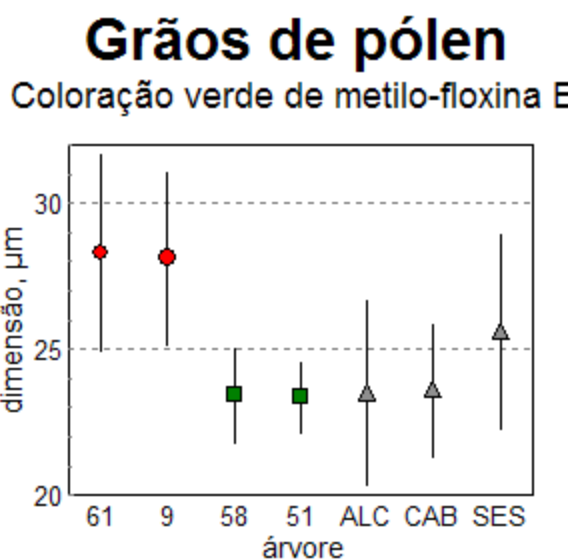


Figura 6.6 — Dimensões dos grãos de pólen, ilustrando os valores médios $\pm$ desvio-padrão para cada árvore (60 observações cada).

As contagens de grãos de pólen “intactos” em cada preparação veio a revelar um contraste entre os híbridos e as restantes árvores, pois enquanto nestas a percentagem ficou acima dos 90%, naqueles nunca foi além dos 71% (tabela 6.4). O padrão observado parece excluir qualquer hipótese de artefacto relacionado com as manipulações feitas, antes sugerindo uma maior taxa de abortamento dos grãos de pólen nos

híbridos [Rushton 1993].

Tabela 6.4 — Determinação da percentagem de grãos de pólen “intactos”, isto é, com a exina (verde de metilo) e o citoplasma (carmim) presentes, em cada preparação. n. r., não realizada.

Árvore	61		9		58		51		ALC		CAB		SES	
Preparação	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
“intactos”	171	279	342	115	151	79	261	186	n. r.	49	126	156	140	250
total	178	304	360	121	159	88	289	191	n. r.	80	195	240	197	395
%	96	92	95	95	95	90	90	97	n. r.	61	65	65	71	63

F — Nomenclatura botânica para a azinheira ibero-magrebina (variante ‘rotundifolia’)

Há na realidade duas questões a considerar: qual o binómio lineano correcto, isto é, se a distinção em relação ao tipo de *Q. ilex* L. (variante ‘ilex’) é ao nível da espécie ou ao nível infra-específico; e, na segunda possibilidade, qual o epíteto infra-específico correcto.

1) Binómio específico

Referências nomenclaturais mais relevantes [Rothmaler 1941, Vasconcelos & Franco 1954, Franco 1990]:

Quercus ilex L. 1753

Quercus rotundifolia Lam. 1785

Quercus ballota Desf. 1790

Abstraindo dos caracteres foliares, a distinção entre a variante ‘ilex’ e a ‘rotundifolia’ só existe ao nível do perianto masculino [Franco 1990]: ângulo na extremidade dos lóbulos (ovado-agudos vs. ovado-obtusos, respectivamente) e vilosidade na ântese, esta apenas em ‘ilex’ e sem ser constante. No entanto, Rothmaler [1941] acrescenta diferenças na copa («ramos por fim pendentes» na ‘rotundifolia’) e nos estigmas («muito mais largos»).

A espécie mais próxima para a qual foi possível obter uma descrição detalhada, por um mesmo autor [Franco 1990], é *Q. coccifera* (figura 6.1): usando o mesmo método, a distinção entre ‘ilex’ e *Q. coccifera* (os estados de carácter citados são deste último) verifica-se: na casca (lisa), no tomento dos rebentos (ralo e precocemente caduco), nas gemas (1-2 mm, glabrescentes), nos amentos masculinos (podem ser abaixo de 3 cm e o ráquis é glabrescente), no perianto masculino (lóbulos ciliados), nas

anteras (papilosas e mais curtas que os filetes), nos estigmas (não-claviformes), na maturação do aquénio (pode ser bienal), no pedúnculo frutífero (pode ser abaixo de 8 mm, glabro) e nas escamas da cúpula (ovado-lanceoladas, prolongadas em ponta rígida e picante, reflexas).

Apesar de ser mais adequado comparar com espécies ainda mais próximas da variante ‘*ilex*’, designadamente *Q. baloot* Griff. [Schwarz 1936], a comparação com *Q. coccifera* parece justificar considerarem-se as variantes ‘*ilex*’ e ‘*rotundifolia*’ da mesma espécie, adoptando-se para ambas o binómio mais antigo (*Q. ilex* L.). Caso contrário, adopta-se *Q. rotundifolia* Lam., e o nome dos híbridos de sobreiro e desta azinheira chamam-se *Q. × mixta* Vill. ex Colm. (1888).

Um dos conceitos aceites para subespécie [Lawrence 1951, pág. 54] é perfeitamente conforme a este caso: «variante morfológica principal de uma espécie com distribuição geográfica própria, distinta das áreas ocupadas por outras subespécies da mesma espécie». De facto, a distinção entre as variantes ‘*ilex*’ e ‘*rotundifolia*’ reside em caracteres morfológicos (essencialmente as folhas) e na distribuição geográfica [De Candolle 1864, Rothmaler 1941, Vasconcelos & Franco 1954, Franco 1990]. Por outro lado, as diferentes exigências climáticas de ‘*ilex*’ e ‘*rotundifolia*’ correspondem à distinção entre ecótipos, que é um nível biossistemático infra-específico [Lawrence 1951].

A listagem de Govaerts & Frodin [1998] adopta *Q. rotundifolia* Lam. como válido, presumivelmente em concordância com Schwarz [1936], o que implica a separação em duas espécies mas, face aos argumentos acima, ela não é seguida no presente trabalho. Pelo menos uma publicação de Schwarz evidencia a tendência deste autor para elevar o nível taxonómico dos táxones dentro dos *Quercus* (também discutida na “Revisão bibliográfica”, parte I, secção A1, a propósito dos subgéneros): das seis espécies novas por ele propostas em 1935 [Schwarz 1935], duas (*Q. estremadurensis*, *Q. bornmuelleriana*) distinguem-se ao nível de subespécie dentro doutras espécies, outras duas (*Q. esculiformis*, *Q. sintenisiana*) são meros sinónimos, e outra (*Q. cerridolepis*) não é reconhecida, mas sem estar esclarecida a sua sinonímia [Govaerts & Frodin 1998].

2) Epíteto infraspecífico

Considerando a distinção ao nível de subespécie, a variante ‘*ilex*’ é a autónoma e designa-se *Q. ilex* L. subsp. *ilex*. Quanto à variante ‘*rotundifolia*’, as referências nomenclaturais mais relevantes são [Morais

1940, Vasconcelos & Franco 1954, Franco 1990, Govaerts & Frodin 1998]:

Q. ilex var. *ballota* (Desf.) Camb 1827

Q. ballota var. *rotundifolia* (Lam.) Webb 1838

Q. ilex var. *rotundifolia* (Lam.) Trab. 1905

Q. ilex subsp. *ballota* (Desf.) Samp. 1909

Q. ilex subsp. *rotundifolia* (Lam.) Schw. ex Tab. Morais 1940

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica de St. Louis, 1999, o epíteto infra-específico mais antigo para a espécie respectiva é o que é válido (artº 11.4), e recomenda-se que o epíteto a atribuir a uma subespécie não autónoma seja o de uma das variedades a ela subordinadas (recomendação 26A.2); além disso, o autor será aquele que fez a descrição ou diagnose que validaram esse epíteto (artigo 46.4), e a reclassificação sem alteração do nível taxonómico não pode alterar essa autoria (artigo 49). A referência de 1827 está incluída numa enumeração de espécies das ilhas Baleares feita por Jacques Cambessèdes, e é interessante porque as duas variantes estão presentes nestas ilhas [Rothmaler 1941], mas não foi possível verificar se inclui uma diagnose ou descrição, ou como justifica a distinção a nível infra-específico (observações de hibridismo?). Considerando que *lhe* é equivalente a designação feita por De Candolle em 1864, associada a uma correcta distinção morfológica e geográfica [Vasconcelos & Franco 1954], deduz-se que o trinómio a adoptar-se seja *Q. ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Camb., ou quando muito terminada com Camb. ex A. DC. (apesar de De Candolle não fazer referência a Cambessèdes); porém, neste caso, levantar-se-ia a questão da prioridade da designação *Q. ilex* subsp. *rotundifolia* (Lam.) Webb..

A recomendação 24B.2 do mesmo Código (retenção do epíteto final da espécie quando um táxone passa desse nível para o de subespécie) teria de aplicar-se em 1827 e não actualmente.

Conclui-se assim que nem a designação adoptada na *Flora Iberica* (a de 1909), nem a adoptada por Vasconcelos & Franco e pela *Flora Europæa* (a de 1940, em ambos os casos ignorando a referência “Schwz. ex”), teriam prioridade; além disso, verifica-se que ambas têm bases surpreendentemente frágeis: na *Flora Iberica* justifica-se que a designação original de “raça” seria assimilável à de subespécie [Franco 1990], porém ela foi originalmente atribuída às azinheiras de bolota doce [Sampaio 1909], o que entretanto ficou claro ser apenas uma variante ao nível da forma, existente tanto em ‘*ilex*’ como em ‘*rotundifolia*’ [Morais 1940,

Vasconcelos & Franco 1954]; além disso, a autoria de 1864 (se não a de 1827), actualizada para subespécie, teria prioridade. Assim, a designação adoptada na *Flora Iberica* parece ilegítima.

Quanto à designação de 1940, é um mistério por que razão Taborda Morais (que precedentemente utilizava *Q. ilex* var. *ballota* (Desf.) [Morais 1936]), atribui a Schwarz a autoria pois indirectamente se deduz que este se mantinha nessa altura com a distinção *Q. rotundifolia* Lam. [Rothmaler 1941]. Talvez por isso seja corrente a autoria estar com Schw. ex Tab. Morais [Govaerts & Frodin 1998], mas mesmo essa não é validada, porque a primeira descrição e diagnose sob este nome, e ainda discussão detalhada do problema taxonómico, é feita por Vasconcelos e Franco em 1954¹.

3) Conclusão

É evidente que a designação *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* (Lam.) Schw. ex Tab. Morais só se mantém por inércia. O definitivo esclarecimento da nomenclatura correcta terá de ser feito pela verificação da prioridade da designação de 1827 e, em caso negativo, da de 1838. Se ambas não tiverem validade, e dentro da premissa que se trata duma distinção a nível subespecífico em relação ao tipo de *Q. ilex*, então a designação *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Lam.) A. DC. é seguramente a que deve ser adoptada. Contudo, e na persistência de incertezas, e visto que se trata duma designação não adoptada, parece o mais sensato manter-se a designação de 1940, se bem que esta inércia não seja tolerável a prazo.

Um especial agradecimento pelas produtivas discussões mantidas com a Dr^a Carla Cruz (Departamento de Biologia, Universidade de Lisboa), Prof^a Ana Isabel Correia e Dr^a Alexandra Escudeiro (Museu e Jardim Botânico da Universidade de Lisboa).

Referências adicionais:

<http://www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code/SaintLouis/0000St.Luistitle.htm>
(*International Code of Botanical Nomenclature* (St Louis Code, 1999). Regnum Vegetabile 138. W. Greuter, Chairman. Koeltz Scientific Books, Königstein, 2000)
Cambessèdes, J., 1827 — *Enumeratio Plantarum quas in insulis Balearibus collegit*, pág. 137, reimpress. ex Mem Mus. Hist. Nat. Paris, 14
De Candolle, A., 1864 — *Prodr.* Vol. 16 Tomo 2 pág. 39.
Morais, A. T., 1936 — Notas sobre a flora portuguesa. *Bol. Soc. Brot.* Série II Vol. 11 pág. 162.
Morais, A. T., 1940 — Novas áreas da fitogeografia portuguesa. *Bol. Soc. Brot.* (II) Vol. 14 pp. 97-138.

¹ Ressalvando-se a possibilidade disso ter já sido feito nas referências de 1838 e 1905, mas segundo parece são duma época em que a distinção apenas se baseava no sabor das bolotas [Rothmaler 1941], incorrecta portanto.

Sampaio, G., 1909 — *Bol. Soc. Brot. Série I* Vol. 24 pág. 102.

Schwarz, O., 1935 — *Einige neue Eichen des Mediterrangebiets und Vorderasiens. Notizbl. Bot. Gart. u. Mus. zu Berlin-Dahlem* Vol. 12 pp. 461-469.

Apêndice III: protocolos, tinas de electroforese e formulário

A — Protocolos

1) Preparação de extractos enzimáticos

a) Pesar 400 mg de folhas após retirar os pecíolos, limpas e na medida do possível sem parasitas, defeitos ou áreas necrosadas, e colocá-las num almofariz. Caso se utilizem sementes, corta-se uma calote de poucos milímetros da extremidade mais larga (a que se insere na cápsula do fruto, implicando apenas a porção distal dos cotilédones) e secciona-se em lâminas finas para facilitar a maceração².

b) Verter aproximadamente 25 mL de azoto líquido sobre as folhas e macerá-las até evaporar-se o azoto e repetir (sugestão: usar uma colher de 50 mL para retirar o azoto líquido da garrafa e repartir em duas metades por dois almofarizes, apenas um contendo as folhas; para a repetição é suficiente transferir o azoto ainda existente no segundo almofariz). É importante reduzir as folhas a pó (figura 3.2 a), principalmente no caso das azinheiras jovens, cujas folhas são muito fibrosas.

c) Com a ajuda de uma espátula e usando um funil, transferir o pó para um tubo de 2 mL e pipetar 1 mL de meio de extracção (usando de preferência uma pipeta de Pasteur de plástico (por exemplo Brand BRAA747755), agitando o conteúdo com o tubo fechado de modo a assegurar que todo o pó fica embebido pelo líquido. Colocar o tubo no banho de gelo.

d) A cada tubo contendo um macerado de folhas embebido em meio de extracção, realizar uma homogenização durante 10 segundos (com um homogenizador de lâminas, por exemplo o modelo X120 da marca CAT, Staufen, Alemanha, munido com a sonda T6), à velocidade máxima e

² Embora não se tenha investigado sobre o efeito da inclusão do tegumento da semente na obtenção de resultados, o facto de ser tecido materno levou *a priori* à precaução de retirá-lo sistematicamente da amostra de cotilédones, o que não deixava de atrasar um pouco o ritmo do processamento das amostras.

imerso no banho de gelo. Apesar desta imersão, mais tempo implica acumulação de calor que pode inactivar enzimas; por isso, para facilitar a homogenização é muito importante ter conseguido pulverizar as folhas completamente no passo b (maceração em azoto líquido), assim como é recomendável fazer uma pré-homogenização a velocidade reduzida, geralmente com a duração de 10 a 20 segundos (figura 3.2 b, c).

e) Centrifugar os tubos com os homogenatos durante 10 minutos a 5000 *g* e retirar 100 μ L de sobrenadante (de cor amarelo dourado a verde, segundo a proporção de cloroplastos em suspensão, figura 3.2 c; no caso dos extractos de cotilédones e de folhas albinas, são quase transparentes) para um tubo de plástico de 0,5 mL contendo 5 μ L do cocktail de inibidores a 20 $\times$ (ou 10 μ L do cocktail a 10 $\times$) e misturar bem. Devem processar-se no máximo 6 amostras por centrifugação para que nenhuma espere demasiado tempo até esta transferência ser completada. Além disso, verificou-se que este ritmo permite 2 pessoas alternarem eficientemente na utilização dos mesmos equipamentos, isto é, uma está a realizar os passos a–c enquanto a outra está nos d–e), duplicando o número de amostras que se podem processar para o mesmo período de tempo.

f) Guardar os extractos a –20 °C (podem esperar uma ou duas horas no banho de gelo enquanto outras amostras estão a ser processadas), só devendo sair desta temperatura o tempo estritamente necessário para aplicação nos géis (protocolo 3).

2) Dissolução do amido e sua aplicação no molde do gel

a) Preparar previamente o molde do gel: sobre vidro temperado de 4 mm de espessura com 24,6 cm $\times$ 20,6 cm, fixar com molas de escritório 4 barras de acrílico com 1,9 cm de largura e 1,2 cm de altura, tal que se defina, sem fugas, um paralelepípedo com 20,8 cm (largura, lado maior) $\times$ 16,8 cm (eixo da corrente, lado menor) $\times$ 1,2 cm disponível para ser ocupado pelo amido dissolvido e formar-se o gel.

b) Suspender o amido homogeneamente em cerca de 1/3 (90 a 100 mL) do tampão de gel dentro de um frasco Kitasato de 1 L, enquanto se ferverem os restantes 2/3 do tampão num forno de micro-ondas.

c) Verter a solução fervente sobre a suspensão de amido, para formar a solução viscosa que se homogeneiza rapidamente agitando o frasco com a mão (figura 6.6 a).

d) Colocar a solução sobre um bico de Bunsen, agitando-se cada 10 segundos aproximadamente, até que (normalmente em menos de 1

minuto) se formam grandes bolhas de gás a subirem pela superfície interna do frasco (figura 6.6 b).

e) Desgaseificar a solução (figura 6.6 c), vedando a boca do frasco com uma rolha e ligando-o pela abertura lateral a uma linha de vácuo (tromba de água de preferência, ou então uma bomba de vácuo suficientemente potente). A ebulição aumenta substancialmente de início, por isso tem de evitar-se que atinja a saída para a linha de vácuo — eventualmente será necessário afrouxar ligeiramente a sucção. Ao fim de cerca de meio minuto de desgaseificação a ebulição já deve ter-se reduzido, e não convém que se prolongue demasiado este passo, especialmente porque pode alterar a viscosidade da solução [May 1991].

f) Na altura de verter para o molde do gel retira-se o tubo de união à linha de vácuo (de modo nenhum se deve desligar o vácuo enquanto está ligado ao frasco, por perigo de refluxo a partir da linha de vácuo) e verte-se para o molde, que deve estar ligeiramente inclinado para facilitar o espalhamento da solução (figura 6.6 d).

3) Colocação das amostras no gel

1. Retiram-se as barras de acrílico e coloca-se o gel, orientado com o lado maior paralelo ao plano dos olhos (figura 3.3 a).

2. Com fio de pesca, separar do vidro os cerca de 3 a 6 cm de gel mais próximos (figura 3.3 a).

3. Sem retirar o fio de baixo do gel, fixar firmemente um dos lados do fio e produzir uma fenda paralela ao lado maior do gel levantando o fio do outro lado com um movimento relativamente rápido (figura 3.3 b).

4. Deslizar a porção mais pequena do gel de modo a abrir a fenda em cerca de 2 mm (figura 3.3 c).

5. Colocar o gel sobre os acumuladores de frio a serem utilizados durante a electroforese para efectuarem a refrigeração. Retirar as amostras (cada uma contendo um extracto a analisar) do congelador para um banho de gelo, ordenando-as em grupos de 10.

6. Transferir uma porção de cada amostra para a fenda aberta no gel, colocando na posição respectiva, em contacto com a porção maior do gel, um aplicador de papel Whatman nº 1 com aproximadamente 1 cm × 0,3 cm depois de embebido na amostra correspondente; apenas cerca de 2/3 da altura do aplicador são embebidos [May 1991], e o excesso de líquido é removido com papel absorvente; manipula-se o aplicador com uma pinça microcirúrgica.

7. Ao fim de cerca de 5–10 minutos, fecha-se a fenda e procede-se à montagem do dispositivo de electroforese.

B — Montagem das tinas com os eléctrodos

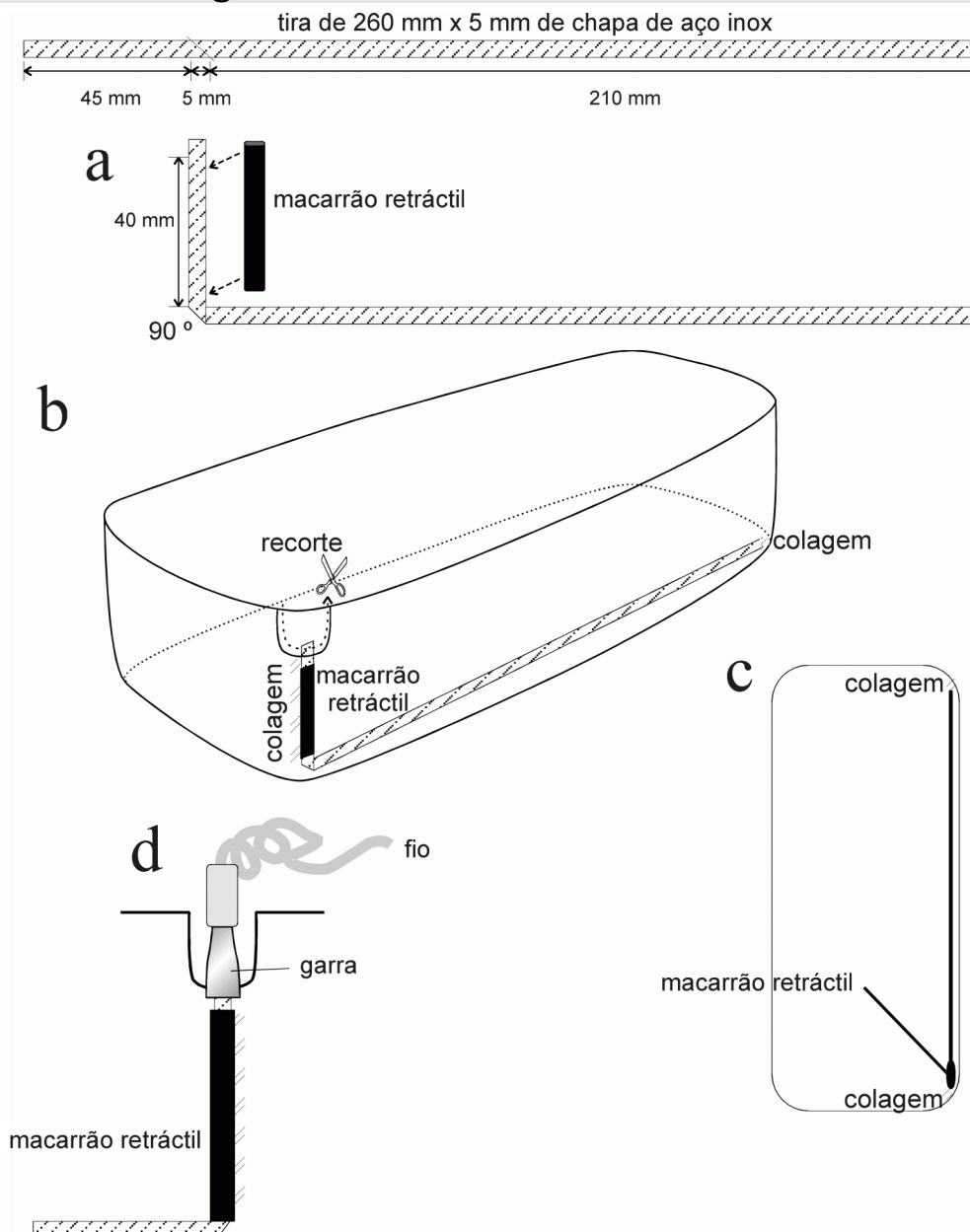


Figura 6.7 — Montagem das tinas com os eléctrodos a partir de caixas de plástico e tiras de aço inoxidável. a) Dobragem da tira de aço e protecção com macarrão retráctil (isolador). b) Posicionamento do eléctrodo na tina, com indicação dos pontos de colagem (cola de silicone) e recorte do rebordo da tina para expor a extremidade do eléctrodo. c) Planta da tina. d) Pormenor da tina vista pelo lado de dentro, mostrando a ligação à fonte de voltagem através de uma garra que contacta com o eléctrodo.

C — Formulário

1) Soluções

Mantiveram-se as soluções descritas na tabela 6.4, para mais rápida preparação das soluções de trabalho:

Tabela 6.4 — Soluções prontas a usar.

Solução	Volume ^a	Medições	Comentários ^b
Acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 (AcNa)	1 L	8,822 g de acetato de sódio (tri-hidrato, Merck 106267)	Dissolver em 800 mL de água, titular pH com aproximadamente 2 mL ácido acético glacial e aferir volume final com água
Ácido bórico 0,5 M	2 L	61,83 g de ácido bórico (Merck 100165)	
Ácido cítrico 1 M	250 mL	52,535 g de ácido L-cítrico (mono-hidrato, Merck 100244 ou Sigma C-7129)	
AEBSF 10 mM	5 mL	300 mg de AEBSF (Calbiochem 101500)	Conservação a 4 °C em volumes de 500 µL
BSA 50 mg/mL	10 mL	500 mg de albumina de soro de bovino, fracção V (Sigma A-7906)	Conservação a -20 °C em volumes de 1 mL
CaCl ₂ 1 M	50 mL	10,95 g CaCl ₂ · 6H ₂ O (Merck 2072)	Fortemente higroscópico
DTT 1M	10 mL AcNa	1,5425 g de ditioneitol (Promega V315A)	Dissolução em acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, conservação a -20 °C em volumes de 1 mL
E-64 1 mM	2,8 mL	1 mg de E-64 (o conteúdo dum tubo, no caso do reagente da Calbiochem 324890)	A dissolução é bastante difícil e procedeu-se do seguinte modo: o E-64 suspenso na água era transferido para um tubo de 4 mL, onde se usava o homogenizador para efectuar a dissolução. Conservação a -20 °C em volumes de 400 µL
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 mL	18,61 g de EDTA (sal dissódico de tetra-acetato de etilenodiamina di-hidrato, BDH 28025)	Feita a suspensão em 80 mL de água, com agitação, titula-se para pH 8,0 com aproximadamente 15 mL NaOH 5 N, para dissolver, aferindo o volume final com água
Fosfato básico 0,2 M	1 L	28,392 g Na ₂ HPO ₄ (J. T. Baker 0306)	
Fosfato ácido 1 M	250 mL	34,498 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (J. T. Baker 0303)	

Solução	Volume ^a	Medições	Comentários ^b
Fosfato 1 M pH 6,0	250 mL	34,498 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (J. T. Baker 0303)	Dissolver em 220 mL de água, titular pH com aproximadamente 18 mL de NaOH 5 N, aferir volume final com água
Fosfato 0,1 M pH 7,0	250 mL	72,1 mL fosfato básico 0,2 M + 10,6 mL fosfato ácido 1 M	Quantidades exactas para o volume pretendido [Sambrook <i>et al.</i> 1989], não é necessário corrigir
Fosfato 0,1 M pH 7,5	250 mL	105 mL fosfato básico 0,2 M + 5 mL fosfato ácido 1 M	Dilui-se para 240 mL e corrige-se pH com aproximadamente 2,5 mL NaOH 0,5 N
H ₂ O ₂ 3%	100 mL	10 mL H ₂ O ₂ a 30% (Aldrich 21676-3)	Conservação a 4 °C
HCl 1 N	250 mL	21,55 mL de ácido clorídrico concentrado (37%)	Fumos intoxicantes
Iodoacetato 100 mM	15 mL	288 mg de ácido iodoacético (Sigma I-1014)	Conservação a –20 °C em volumes de 1,5 mL
KI 0,1 M	1 L	16,6 g iodeto de Potássio (May & Baker)	
Lactato 0,5 M pH 7,0	250 mL	11 mL ácido DL-láctico 85% (Sigma L-1250)	
LiOH 1 M	1 L	41,96 g de hidróxido de lítio (Sigma L-4256)	
MgCl ₂ 1 M	100 mL	20,331 g de cloreto de magnésio (hexa-hidrato, BDH 29096)	Fortemente higroscópico
DL-Malato 0,5 M	250 mL	16,75 g ácido DL-málico (Sigma M-0875)	Juntar 27,5 g NaHCO ₃ (Sigma S-8875), pH final neutro [May 1991]
L-Malato 0,3 M pH 7,0	100 mL	4,02 g ácido L-málico (Sigma M-1000)	Juntar 6,6 g NaHCO ₃ , pH final neutro
MTT 10 mg/mL	50 mL	500 mg de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (Merck 111714)	Solução quase saturada. Conservação a –20 °C em volumes de 1 mL. Depois de descongelado, pode apresentar precipitado, mas dissolve-se bem na solução de revelação.
NAD 20 mg/mL	50 mL	1 g NAD (Sigma N-7004)	Conservação a –20 °C em volumes de 1 mL.
NaOH 0,5 N	250 mL	5 g de hidróxido de sódio	
NaOH 5 N	100 mL	20 g de hidróxido de sódio	Fortemente exotérmica
PMS 2 mg/mL	50 mL	100 mg de metossulfato de fenazina (Sigma P-9625)	Conservação a –20 °C em volumes de 1 mL [Worsfold <i>et al.</i> 1977]
Tio-sulfato de sódio 0,1 M	250 mL	6,205 g de tio-sulfato de sódio (Sigma S-8503)	

Solução	Volume ^a	Medições	Comentários ^b
Tris 2 M	250 mL	60,57 g de Tris base (tris-etanolamina hidroxilo Merck 108382)	
Tris 1 M pH 8	250 mL	30,285 g de Tris base	Dissolver em 230 mL de água, titular pH com aproximadamente 9,5 mL de HCl concentrado (37%), aferir volume final com água
Tris 1 M pH 8,5	250 mL	30,285 g de Tris base	Dissolver em 230 mL de água, titular pH com aproximadamente 8 mL de HCl concentrado (37%), aferir volume final com água
Tris 1 M c/ Mg pH 9,0	100 mL	50 mL Tris 2 M + 5 mL MgCl ₂ 1 M	Dilui-se para 90 mL e corrige-se pH com aproximadamente 2,5 mL HCl 1 N

^a Dissolução em água excepto onde especificado

^b Conservação à temperatura ambiente excepto onde especificado

2) Meio de extracção de enzimas

Para 100 mL:

Pesar 388 mg de L-histidina (Sigma H-8000), 456 mg de Ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES, Merck 115226), 4,952 g de ascorbato de sódio (Sigma A-7631) e 12,5 g de polivinilpirrolidona (Sigma PVP40T ou PVP40), dissolvendo-os em 48 mL de água com uma espátula. Misturar bem estes 4 sólidos antes de juntar a água, e adicionar a água progressivamente à medida que a “pasta” de PVP40 se vai hidratando. A dissolução é ligeiramente exotérmica e o líquido acumula muitas bolhas de gás.

Juntar 25 mL de etilenoglicol (Sigma E-9129), 8 mL de sulfóxido de metilo (DMSO, Aldrich 47230-1), 2 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, 500 µL de DTT 1 M, e 4 mL de BSA a 50 mg/mL.

Numa proveta graduada, perfazer os 100 mL com água (geralmente é necessário um volume inferior a 1 mL). Registar o valor do pH (deve estar perto do valor 6,5, mas ocasionalmente pode chegar a 6,7). Guardar a -20°C .

3) Cocktails de inibidores de proteases

Fórmula A (a mais frequentemente utilizada), 20×:

Para 500 µL (cerca de 100 amostras), adicionar 100 µL AEBSF a 10 mM + 100 µL E-64 a 1 mM + 100 µL iodoacetato a 100 mM + 200 µL EDTA a 0,5 M pH 8,0. Uma vez preparado, este cocktail é utilizável no prazo de poucos dias se mantido sempre a 4°C . Utilizam-se 5 µL por cada 95 µL de extracto, tal que as concentrações

dos inibidores no extracto são:

AEBSF. 100 µM

E-64. 10 µM

Iodoacetato. 1 mM

EDTA. 10 mM

Fórmula B, 10×:

Hidratação da fórmula de uso genérico da Sigma, fornecida na forma de pó liofilizado (Sigma P-2714, lote 28H5855), conforme as indicações do fabricante. Usando uma seringa hipodérmica, injectar 10 mL de água no frasco com o liofilizado. Completada a dissolução, distribuir por volumes de 250 µL, congelando a -20°C . Uma vez descongelado para utilização, conserva-se a 4°C durante alguns dias. As concentrações dos inibidores no extracto são, segundo o folheto que acompanha este produto:

AEBSF. 2 mM

E-64. 14 µM

Bestatina. 130 µM

Leupeptina. 1 µM

Aprotinina. 0,3 µM

EDTA. 1 mM

4) Soluções de revelação dos isoenzimas

Tabela 6.5 — Preparação das soluções de revelação, ordenadas pelo acrónimo adoptado para cada actividade enzimática. Na segunda coluna consideram-se 2 tipos: imersão (em geral 100 mL de solução para 2 geis) ou camada de agarose (20 mL de solução para 2 geis). Cada solução começa pela pesagem dos componentes sólidos, adicionados ao recipiente pela ordem indicada, a que se juntam os componentes líquidos, também pela ordem indicada. A G6PD é de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma G-8404), que permite a utilização de NAD em vez de NADP nas incubações, que se torna bastante mais barata. Os 10 mL de agarose consistem de 160 mg de agarose tipo I-A (Sigma A-0169), dissolvida em 10 mL de água no forno de micro-ondas, deixando-se arrefecer para aproximadamente 50 °C antes de adicionar à restante solução de revelação. Actividades que nunca foram observadas têm resultado com ponto de interrogação. A referência do fornecedor só é incluída para a 1ª ocorrência de cada reagente.

Activ.	Tipo	Sólidos	Líquidos	Incubação	Resultado
ODH	Imersão	—	10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 88 mL água + 1 mL MTT + 1 mL PMS	Escuro, t.a., 2 horas	bandas azul-escuro sobre fundo branco
AAT	Imersão	72 mg ácido α -cetoglutárico (Sigma K-1750) + 544 mg L-Asp (Sigma A-9256) + 50 mg piridoxal fosfato (Sigma P-9255) + 100 mg Fast Blue BB (Sigma F-0250)	10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 80 mL água + 50 μ L EDTA 0,5 M pH 8,0 + NaOH 0,5 N para pH 8,0 + água	Escuro, t.a., durante a noite	Bandas azul-esverdeado sobre fundo laranja
ACP	Imersão	100 mg ácido α -naftil fosfato (sigma N-7000) + 10 mg Fast Garnet sal GBC (90%, Sigma F-8761)	50 mL AcNa 0,1 M pH 5,0 + 50 mL água	t.a., durante a noite	bandas grená sobre fundo alaranjado
ACP-F	Imersão	50 mg metilumbeliferil-fosfato (Sigma M-8883)	50 mL AcNa 0,1 M pH 5,0	Escuro, t.a., 30-60 min.	Fluorescente
ADH	Imersão	—	10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 86 mL água + 1 mL MTT + 1 mL PMS + 2 mL etanol (Merck 100983)	Escuro, t.a., 2 horas	bandas azul-escuro sobre fundo branco
AKP	Imersão	100 mg ácido α -naftil fosfato + 10 mg Fast Garnet sal GBC	10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 90 mL água	t.a., durante a noite	?
ALD	Agarose	75 mg fructose 1,6-difosfato (Sigma 752-1) + 25 mg arsenato de sódio (Sigma A-6756)	1 mL Tris 1M pH 8,5 + 1 mL NAD + 6 mL água + 1 mL MTT + 40 U GAPD (Sigma G-0763) + 1 mL PMS + 10 mL agarose	Escuro, 37 °C, 2 horas, e t.a. durante a noite	bandas azul

Activ.	Tipo	Sólidos	Líquidos	Incubação	Resultado
CAT	Imersão	—	10 mL fosfato 0,1 M pH 7,0 + 7 mL tio-sulfato 0,1 M + 5 mL H ₂ O ₂ 3% + 78 mL água	t.a. 5–15 minutos	Descartar a solução e juntar KI 0,1 M; ao fim de 15–30 minutos, bandas brancas sobre fundo negro-azulado; parar com água
DIA	Imersão	1 a 2 mg DCPI (2,6-diclorofenolindofenol, Sigma D-1878) + 25 mg NADH (Merck 124644)	10 mL tris 1 M pH 8,5 + 89 mL água + 1 mL MTT	Escuro, t.a., até 2 horas	bandas carmim sobre fundo azul, tornando-se azul sobre fundo claro após diferenciação
EST	Imersão	A: 40 mg α -naftil acetato (Sigma N-8505) + 40 mg α -naftil butirato (Sigma N-8000) B: 100 mg Fast Blue BB	solução A: dissolver sólido em 1 mL acetona (J. T. Baker 8002) a 0 °C e conservar no gelo; sol. B: 10 mL fosfato 1 M pH 6,0 + 90 mL água e dissolver sólido. Misturar A + B	t.a. durante a noite	bandas cinzento-escuro sobre fundo avermelhado
EST-F	Imersão	60 mg metilumbeliferil-acetato (Sigma M-0883)	10 mL fosfato 1 M pH 6,0 + 90 mL água	Escuro, t.a., 30-45 min.	Fluorescente
FBP	Imersão	40 mg fructose 1,6-difosfato + 50 mg arsenato de sódio	10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 87 mL água + 1 mL NAD + 1 mL MTT + 100 μ L MgCl ₂ 1 M + 100 U PGI (Sigma P-5381) + 60 U G6PD + 1 mL PMS	Escuro, 37 °C, 2 horas, e t.a. durante a noite	?
G2D	Imersão	100 mg ácido DL-glicérico (Sigma G-7274)	10 mL Tris 1M pH 8,5 + 87 mL água + 1 mL NAD + 1 mL MTT + 1 mL PMS	Escuro, t.a., 2 horas	bandas azul-escuro sobre fundo branco
G6PD	Imersão	100 mg fructose 6-fosfato (Sigma F-3627 ou Calbiochem 344342) + 10 mg NADP (Merck 124541)	10 mL Tris 1M pH 8,5 + 87,5 mL água + 0,5 mL MgCl ₂ 1M + 1 mL MTT + 50 U PGI + 1 mL PMS	Escuro, 37 °C, 2 horas	bandas azul
GAPD	Imersão	55 mg fructose 1,6-difosfato + 150 mg arsenato de sódio	10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 87 mL água + 1 mL NAD + 1 mL MTT + 50 μ L ALD (Sigma A-9562) + 1 mL PMS	Escuro, 37 °C, 2 horas, e t.a. durante a noite	bandas azul
GDH	Agarose	120 mg ácido L-glutâmico (Fluka 49450) + 60 mg ADP (Sigma A-2754)	2 mL tris 1 M pH 8,5 + 4 mL água + 20 μ L EDTA 0,5 M pH 8,0 + NaOH 5 N (acertar pH para 8,0) + ~1 mL água + 1 mL NAD + 0,5 mL MTT + 1 mL PMS + 10 mL agarose	Escuro, 37 °C, 2 horas, e t.a. durante a noite	bandas azul-escuro sobre fundo azul-claro

Activ.	Tipo	Sólidos	Líquidos	Incubação	Resultado
GPT	Imersão	20 mg NADH + 360 mg DL-Ala (Sigma A-7502) + 38 mg ácido α -cetoglutárico	19 mL água + < 0,5 mL Tris 2 M (titular para pH 7,6) + 2 gotas LDH (Sigma L-2500)	Escuro, t.a., 1-2 horas	Fluorescência negativa
GsR	Agarose	50 mg glutatona oxidada (GSSG, Sigma G-4376) + 5 mg NADPH (Merck 124540) + 1-2 mg DCPI	1 mL Tris 1 M pH 8,5 + 8 mL água + 1 mL MTT + 10 mL agarose	Escuro, 37 °C, 2 horas	bandas azul-claro sobre fundo branco
HXK	Imersão	90 mg D-glucose (J. T. Baker 0114) + 10 mg NADP + 50 mg ATP (Merck 101432)	10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 88 mL água + 100 μ L $MgCl_2$ 1 M + 1 mL MTT + 60 U G6PD + 1 mL PMS		
IDH	Agarose	75 mg ácido DL-isocítrico (Sigma I-1252) + 10 mg NADP	1 mL Tris 1 M pH 8,5 + 6,5 mL água + 0,5 mL $MgCl_2$ 1 M + 1 mL MTT + 1 mL PMS + 10 mL agarose	Escuro, t.a., 2 horas	bandas azul-escuro sobre fundo branco
LAP	Imersão	20 mg L-leucil- β -naftilamida (Sigma L-0376) + 10 mg Fast Garnet sal GBC (90%)	100 mL Tris 0,05 M pH 7,0 (titulando o de pH 8,0 com HCl 1N)	t.a., durante a noite	bandas carmim sobre fundo laranja
LDH	Imersão	—	10 mL DL-lactato 0,5 M pH 7,0 + 10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 1 mL NAD + 77 mL água + 1 mL MTT + 1 mL PMS	Escuro, 37 °C, 2 horas	bandas azul
MDH	Imersão	—	10 mL tris 1 M pH 8,5 + 5 mL malato 0,5 M + 82 mL água + 1 mL NAD + 1 mL MTT + 1 mL PMS	Escuro, t.a., até 2 horas	bandas azul-escuro sobre fundo branco
ME	Imersão	20 mg NADP	10 mL ácido L-málico 0,3 M pH 7,0 + 10 mL tris 1 M pH 8,5 + 82 mL água + 2 mL $MgCl_2$ 1 M + 1 mL MTT + 1 mL PMS	Escuro, t.a., até 2 horas	?
PEP	Agarose	50 mg L-Gly-Leu (Sigma G-2002) + 20 mg PER (Sigma P-8125) + 16 mg o-dianisidina (Sigma D-3252) + 20 mg a.a.-oxidase (Sigma V-7000)	2 mL Tris 1 M pH 8,5 + 8 mL água + 10 mL agarose	?	?
PER	Imersão	50 mg 3-amino-9-carbazole (Sigma A-5754)	solução A: dissolver sólido em 1,25 mL N,N'-dimetilformamida (Sigma D-4254); sol. B: 12 mL AcNa 0,1 M pH 5,0 + 84,5 mL água + 2 mL H_2O_2 3% + 200 μ L $CaCl_2$ 1 M. Misturar A + B	t.a., até 2 horas	bandas vermelho ou vermelho-acastanhado sobre fundo claro

Activ.	Tipo	Sólidos	Líquidos	Incubação	Resultado
PFK	Imersão	10 mg ATP + 50 mg fructose 6-fosfato + 50 mg arsenato de sódio	10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 89 mL água + 1 mL NAD + 500 U TPI (Sigma T-2391) + 40 U ALD + 40 U GAPD + 50 µL MgCl ₂ 1 M	Escuro, t.a., 30-60 min.	Fluorescente
PGD	Agarose	20 mg ácido 6-fosfogluconico (Sigma P-7627) + 8 mg NADP	1 mL Tris 1 M pH 8,5 + 7 mL água + 100 µL MgCl ₂ 1 M + 1 mL MTT + 1 mL PMS + 10 mL agarose	Escuro, t.a., durante a noite	bandas azul-escuro sobre fundo claro
PGI	Agarose	40 mg fructose 6-fosfato	2 mL Tris 1 M c/ Mg pH 9 + 5 mL água + 1 mL NAD + 1 mL MTT + 50 U G6PD + 1 mL PMS + 10 mL agarose	Escuro, 37 °C, 1-2 horas	bandas azul-escuro sobre fundo claro
PGK	Imersão	10 mg ácido 3-fosfoglicérico (Sigma G-6251) + 10 mg NADH + 10 mg ATP	5 mL Tris 1 M pH 8,5 + 45 mL água + 25 µL MgCl ₂ 1 M + 50 U GAPD	Escuro, t.a., 1-2 horas	Fluorescência negativa
PGM	Agarose	100 mg α-D-glucose-1-fosfato (Sigma G-1259 [Spencer <i>et al.</i> 1964, May 1991])	1 mL Tris 1 M pH 8,5 + 6,5 mL água + 1 mL NAD + 0,5 mL MTT + 60 U G6PD + 1 mL PMS + 10 mL agarose	Escuro, 37 °C, 2 horas	bandas azul-escuro sobre fundo branco
SKD	Agarose	10 mg ácido chiquímico (Sigma S-5375) + 8 mg NADP	1 mL Tris 1 M pH 8,0 + 7 mL água + 100 µL MgCl ₂ 1 M + 1 mL MTT + 1 mL PMS + 10 mL agarose	Escuro, 37 °C, 2 horas, e t.a. durante a noite	bandas azul-escuro sobre fundo claro
SOD	Agarose	20 mg Nitro Blue Tetrazolium (Sigma N-6876)	2 mL Tris 1 M pH 8,5 + 1 mL NAD + 4 mL água + 3 mL PMS + 10 mL agarose	t.a., durante a noite, protegido da evaporação	Foto-oxidação do PMS excepto onde houver actividade (contraste negativo, bandas amareladas sobre fundo arroxado). NAD facultativo (mas menos bandas)
XDH	Imersão	60 mg hipoxantina (Sigma H-9377)	10 mL Tris 1 M pH 8,5 + 88 mL água + 1 mL MTT + 1 mL PMS	Escuro, 37 °C, 2 horas, e t.a. durante a noite	?

Apêndice IV: resumo das famílias analisadas e exemplos de SQL

A — Plantas jovens analisadas

Referência		Alfaiates		Feijoas do Ramos		Mitra		Híbridos		
Lote	nº	Família	nº	Família	nº	Família	nº	Família	nº	
Rc	228	A02	6	F01	4	M01	24	SES	19	
Rh1	234	A03	6	F04	10	M02	6	SM1	43	
Rh2	147	A04	10	F05	10	M04	6	SM2	48	
FAIR	42	A05	6	F06	6	M05	9			
		A08	34	F08	11	M11	6			
		A09	32	F09	10	M12	13			
		A11	9	F10	6	M13	31			
		A12	26	F12	6	M15	6			
		A14	10	F16	6	M16	6			
		A19	6	F18	6	M19	8			
		A20	83	F21	13	M21	2			
		A21	43	F23	14	M22	6			
		A23	6	F25	6	M24	6			
		A26	6	F26	6	M25	10			
		A27	6	F27	46	M26	6			
		A29	39	F28	26	M32	24			
		A30	39	F29	9	M34	6			
		A31	29	F31	6	M37	24			
		A33	13	F32	10	M42	6			
		A34	46	F34	26	M44	6			
		A36	37	F37	6	M46	9			
		A37	9	F39	6	M49	6			
		A38	35	F40	9	M53	6			
		A39	13	F45	6	M55	13			
		A40	6	F47	6	M57	9			
						F51	7	M58	9	
						F52	6	M59	6	
								M60	50	
								M61	5	
								M62	9	
						M63	6			
						M64	13			
						Mitra 1997	76			

B — Ficheiros SQL e sua utilização

1) Determinação do número de plantas jovens analisadas

Este SQL deu origem à tabela da secção anterior.

familias.sql

```
SELECT ORIGEM, COUNT( freq ) . . . . . campos a utilizar: origem,
freq
FROM "zimogramas.DB" Zimogramas. . . . . base de dados
WHERE INDIVIDUOS = 'plântula' . . . . . filtro selector: plântulas
GROUP BY ORIGEM Critério de agrupamento para contagens
ORDER BY ORIGEM Critério de ordenamento para apresentação
```

2) Definição de sobreiros, azinheiras e ambíguos

global-Sb.sql

```
SELECT ORIGEM, INDIVIDUOS, EXTRACCAO, AMOSTRA, DIA, MDH, PER,
PGI, EST, GSR, PGM, PGD
FROM "zimogramas.DB" Zimogramas
WHERE (DIA LIKE 'Sb%')
OR (MDH LIKE 'Sb%')
OR (GSR LIKE 'Sb%')
OR (PGM LIKE 'd')
GROUP BY ORIGEM, INDIVIDUOS, EXTRACCAO, AMOSTRA, DIA, MDH,
PER, PGI, EST, GSR, PGM, PGD
```

Pelo menos um dos critérios (DIA, MDH, GsR ou PGM) é de sobreiro (comparador LIKE)

global-Az.sql

```
SELECT ORIGEM, INDIVIDUOS, EXTRACCAO, AMOSTRA, DIA, MDH, PER,
PGI, EST, GSR, PGM, PGD
FROM "zimogramas.DB" Zimogramas
WHERE (DIA LIKE 'Az%')
OR (MDH LIKE 'Az%')
OR (PGI LIKE 'Az%' OR PGI LIKE '+%')
OR (EST LIKE '1%')
OR (GSR LIKE 'Az%')
OR PGM BETWEEN 'a' AND 'cz'
OR (PGD LIKE '%b')
GROUP BY ORIGEM, INDIVIDUOS, EXTRACCAO, AMOSTRA, DIA, MDH, PER,
PGI, EST, GSR, PGM, PGD
```

Idem, no caso de PGM definido como um intervalo (BETWEEN)

ambiguos-Sb.sql

```
SELECT ORIGEM, INDIVIDUOS, EXTRACCAO, AMOSTRA, DIA, MDH, PER,
PGI, EST, GSR, PGM, PGD
FROM "Sb.DB" Sb
WHERE (DIA NOT LIKE 'Sb%')
OR (MDH NOT LIKE 'Sb%')
```

```
OR (GSR NOT LIKE 'Sb%')
OR (PGM NOT LIKE 'd')
OR (PGI = 'Az')
OR (PGI = '+')
```

Desta vez a partir do *output* do SQL global-Sb.sql (Sb.DB), obtém-se uma tabela à parte com pelo menos um critério ambíguo em relação a sobreiro. A subtracção do novo *output* a Sb.DB permite ficar apenas com sobreiros “puros”.

3) Distribuição de frequências de fenótipos enzimáticos

FenotiposPGM.sql

```
SELECT ORIGEM, INDIVÍDUOS, PGM, COUNT( FREQUENCIA )
FROM "Azinheiras.DB" Azinheiras
WHERE PGM IS NOT NULL
GROUP BY ORIGEM, INDIVÍDUOS, PGM
ORDER BY INDIVÍDUOS
```

Exemplo de obtenção, a partir de azinheiras “puras” (Azinheiras.DB já sem os respectivos “ambíguos”, cf. secção anterior), a distribuição de frequência dos diversos fenótipos de PGM.

Agradecimentos

A Deus e aos meus Pais, pela Graça da Vida e de poder vivê-la como tenho feito até agora.

À Prof^a Carola Meierrose, à Eng^a Carolina Varela e à Prof^a Helena Almeida, por tornarem este trabalho possível e pelo imenso que aprendi junto delas.

À Dr^a Cristina Branco e à Eng^a Ana Cristina Custódio, pela preciosa colaboração neste trabalho, na qualidade de estagiárias (bolseiras do Programa PRODEP Qualidade e do Instituto de Emprego e Formação Profissional, respectivamente), e com quem também aprendi muito.

Ao Projecto PAMAF 8153 pela motivação para encetar este trabalho, e ao Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, cujas portas se abriram para a sua realização, e ainda aos de Sanidade Vegetal, Microbiologia do Solo e Nematologia, do mesmo Instituto, assim como ao de Biologia Molecular do Departamento de Biologia, pela disponibilidade para a resolução de diversos assuntos.

À restante equipa do Projecto PAMAF 8153 (Eng^a Isabel Barros Reforço e Eng^a Fernanda Rodrigues, nomeadamente), aos Viveiros de S^{to}. Isidro, aos proprietários (especialmente ao Dr. Alexandre Cunha Gonçalves), aos caseiros, aos técnicos dos serviços florestais e aos tiradores de cortiça, pela generosa colaboração e ensinamentos.

Aos colegas Prof. Rui Brandão, Prof. Fernando Capela e Silva, Prof. Vítor Hugo Palma Rosa e Prof^a Paula Simões, pela sua disponibilidade e colaboração.

A Adélia Dias.

- Aquaah, G., 1992 — *Practical Electrophoresis for Genetic Research*. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Albuquerque, J. P. M., 1982 — *Carta ecológica (fitoedafoclimática) de Portugal Continental*. Atlas do Ambiente.
- Aldrich, P. R., Parker, G. R., Michler, C. H., Romero-Severson, J., 2003 — Whole-tree silvic identifications and the genetic structure of a red oak species complex in an Indiana old-growth forest. *Can. J. For. Res.* Vol. 33 pp. 2228-2237.
- Alleman, M., Doctor, J., 2000 — Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications. *Plant Mol. Biol.* Vol. 43 pp. 147-161.
- Allen, R. C., Saravis, C. A., Maurer, H. R., 1984 — Enzyme visualization (5.5). in: *Gel electrophoresis and isoelectric focusing of proteins. Selected techniques*. Berlin: Walter & Gruyter pp. 201-13.
- Almeida, M. H., Lourenço, M. J., Sampaio, T., Nunes, A. M., Varela, M. C., Faria, C., Chambel M. R., Pereira, J. S., 2005 — Five years results of provenance trials of *Quercus suber* in Portugal. In Congresso Internacional "Sobrais, fábricas e comerciantes. Passado, presente e futuro da actividade corticeira" Palafrugell (Girona), 16, 17 e 18 de Fevereiro de 2005. (CDROM)
- Anderson, J. W., 1968 — Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* Vol. 7 pp. 1973-1988.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG), 1998 — An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Missouri Bot. Garden* Vol. 85 pp. 531-553.
- Austerlitz, F., Smouse, P. E., 2001 — Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between Φ_{FT} , pollen dispersal and inter-females distance. *Genetics* Vol. 157 pp. 851-857.
- Austerlitz, F., Smouse, P. E., 2002 — Two-Generation Analysis of Pollen Flow Across a Landscape. IV. Estimating the Dispersal Parameter. *Genetics* 161: 355-363.
- Austerlitz, F., Dick, C. W., Dutech, C., Klein, E. K., Oddou-Muratorio, S., Smouse, P. E., Sork, V. L., 2004 — Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Mol. Ecol.* Vol. 13 pp. 937-954.
- Bacilieri, R., Ducouso, A., Petit, R. J., Kremer, A., 1996 — Mating system and asymmetric hybridization in a mixed stand of European oaks. *Evolution* Vol. 50 pp. 900-908.
- Belahbib, N., Pemonge, M.-H., Ouassou, A., Sbay, H., Kremer, A., Petit R. J., 2001 — Frequent cytoplasmic exchanges between oak species that are not closely related: *Quercus suber* and *Q. ilex* in Morocco. *Mol. Ecol.* Vol. 10 pp. 2003-2012.
- Bellarosa, R., 2003 — Introduction: brief synthesis of the current knowledge on cork oak. In: *Handbook of the Concerted Action "European network for the evaluation of genetic resources of cork oak for appropriate use in breeding and gene conservation strategies"*, FAIR 1 CT 95- 0202 (Ed. M. C. Varela), Chapter I pp. 11-24. Estação Florestal Nacional, Lisbon.
- Bellarosa, R., Simeone, M.C., Papini, A., Schirone, B., 2005 — Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp.. *Mol. Phyl. Evol.* Vol. 34 pp. 355-370.
- Benson, L., Phillips, E. A., Wilder, P. A., et al., 1967 — Evolutionary sorting of characters in a hybrid swarm. I: Direction of slope. *Am. J. Bot.* Vol. 54 pp. 1017-1026.
- Berg, E.B., Hamrick, J.L., 1997 — Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Can. J. For. Res.* Vol. 27 pp. 415-424.
- Bernard, A., 1937 — *Afrique septentrionale et occidentale*, Vol. 1. In *Géographie Universelle*, Tome XI (Ed. P. Vidal de la Blache, L. Gallois). Librairie Armand Colin, Paris.
- Black, R. A., Kronheim, S. R., Sleuth, P. R., 1989 — Activation of interleukin 1 β by a co-induced protease. *FEBS Lett.* Vol. 247 pp. 386-390
- Boavida, L. C., Varela, M. C., Feijó, J. A., 1999 — Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.). I. The progamic phase. *Sex. Plant Reprod.* Vol. 11 pp. 347-353.
- Boavida, L.C., Silva, J. P., Feijó, J.A., 2001 — Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.). II. Crossing intra- and interspecific barriers. *Sex. Plant Reprod.* Vol. 14 pp. 143-152
- Bodénès, C., Labbé, T., Pradère, S., Kremer, A., 1997 — General vs. local differentiation between two closely related white oak species. *Mol. Ecol.* Vol. 6 pp. 713-724.
- Bordács, S., Burg, K., 1997 — Genetic differentiation by RAPD-markers of oak species in Hungary. In: *Diversity and Adaptation in Oak Species*. (Ed. K. C. Steiner) Proceedings of the second meeting of Working Party 2.0.8.05, Genetics of *Quercus*, of the International Union of Forest Research Organizations, October 12-17, 1997. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. pp. 121-131.
- Bordács, 2000 — Assessing of cpDNA diversity in Hungarian oak populations and its silvicultural aspects. *Glasnik Za Šumske Pokuše (Annales, Experimentis Silvarum Culturae Provehendis)* Vol. 37 pp. 383-392.
- Borgardt, S. J., Pigg, K. B., 1999 — Anatomical and Developmental Study of Petrified *Quercus* (Fagaceae) Fruits from the Middle Miocene, Yakima Canyon, Washington, USA. *Am. J. Bot.* Vol. 86 pp. 307-325.
- Branco, C., 2000 — *Caracterização isoenzimática de sobreiro e azinheira: aferição de um método*. Trabalho de Fim de Curso para a conclusão da licenciatura em Biologia, Universidade de Évora.
- Brandão, R., 1996 — *Aerobiologia polínica e respectivas aplicações em estudos fenológicos e alergológicos. Uma análise das interações no ambiente mesomediterrânico português (Alentejo: Sul de Portugal)*. Tese de doutoramento, Universidade de Évora.
- Brás, R., 1999 — Estudos quantitativos e fenológicos da floração da azinheira (*Quercus rotundifolia* Lam.) e no sobreiro (*Quercus suber* L.). Herdade da Mitra, Évora. Relatório do trabalho de fim de curso para a licenciatura em Engenharia Agrícola, Universidade de Évora.
- BRENDA — *The Comprehensive Enzyme Information System* <http://www.brenda.uni-koeln.de/> (requer registo individual)
- Broteri, F. A., 1804 — *Flora lusitanica, seu plantarum, quae vel sponte crescunt, vel frequentis coluntur, ex florum praesertim sexibus systematice distributarum, synopsis*. (Pars II ff. 33-34).
- Brown, A. H. D., Allard, R. W., 1970 — Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isoenzyme polymorphisms. *Genetics* Vol. 66 pp. 133-145.
- Bruschi, P., Vendramin, G. G., Bussotti, F., Grossoni, P., 2000 — Morphological and molecular differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in Northern and Central Italy. *Ann. Bot.* Vol. 85 pp.

- 325-323.
- Bult, C. J., Kiang, Y.-T., 1993 — One-dimensional electrophoretic comparisons of plant proteins. *Meth. Enzymol.* Vol. 224 pp. 81-97.
- Burczyk, J., Chybicki, I. J., 2004 — Cautions on Direct Gene Flow Estimation in Plant Populations. *Evolution* Vol. 58 pp. 956-963.
- Burger, W. C., 1975 — The species concept in *Quercus*. *Taxon* Vol. 24 pp. 45-50.
- Canfield, R. E., 1963 — The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme. *J. Biol. Chem.* Vol. 238 pp. 2698-2707.
- Cantos, E., Espin, J. C., Lopez-Bote, C., de la Hoz, L., Ordoñez, J. A., Tomas-Barberán, F. A., 2003 — Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51 pp. 6248-55.
- Cecich, R. A., 1997a — The continuum between flowers and acorns. In: *Diversity and Adaptation in Oak Species*. (Ed. K. C. Steiner) Proceedings of the second meeting of Working Party 2.0.8.05, Genetics of *Quercus*, of the International Union of Forest Research Organizations, October 12-17, 1997. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. pp. 220-234.
- Cecich, R. A., 1997b — Pollen tube growth in *Quercus*. *For. Sci.* Vol. 43 pp. 140-146.
- Cervera, M. T., Remington, D., Frigerio, J.-M., Storme, V., Ivens, B., Boerjan, W., Plomion, C., 2000 — Improved AFLP analysis of tree species. *Can. J. For. Res.* Vol. 30 pp. 1608-1616.
- Chakraborty, R., Nei, M., 1976 — Hidden Genetic Variability Within Electromorphs in Finite Populations. *Genetics* Vol. 84 pp. 385-393.
- Chakraborty, R., Chakravarti, A., Malhotra, K. C., 1977 — Variation in allele frequencies among caste groups of the Dhargars of Maharastra, India: an analysis of Wright's F_{ST} statistic. *Ann. Hum. Biol.* Vol. 4 pp. 275-280.
- Chakraborty, R., Fuerst, P. A., Nei, M., 1978 — Statistical studies on protein polymorphism in natural populations. II. Gene differentiation between populations. *Genetics* Vol. 88 pp. 367-390.
- Chakraborty, R., Fuerst, P. A., Nei, M., 1980 — Statistical studies on protein polymorphism in natural populations. III. Distribution of allele frequencies and the number of alleles per locus. *Genetics* Vol. 94 pp. 1039-1063.
- Chakraborty, R., Kimmel, M., Stivers, D. N., Davison, L. J., Deka, R., 1997 — Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 1041-1046.
- Charlesworth, D., 1995 — Multi-allelic self-incompatibility polymorphisms in plants. *Bioessays* Vol. 17 pp. 31-38.
- Chavariaga-Aguirre, P., Maya, M. M., Tohme, J., Duque, M. C., Iglesias, C., Bonierbale, M. W., Kresovich, S., Kochert, G., 1999 — Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. *Mol. Breed.* Vol. 5 pp. 263-273.
- Chung, M. Y., Nason, J., Chung, M. G., Kim, K.-J., Park, C.-W., Sun, B.-Y., Pak, J.-H., 2002 — Landscape-level Spatial Genetic Structure In *Quercus acutissima* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* Vol. 89 pp. 1229-1236.
- Clark, C. M., Wentworth, T. R., O'Malley, D. M., 2000 — Genetic discontinuity revealed by chloroplast microsatellites in eastern North American *Abies* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* Vol. 87 pp. 774-782.
- Clegg, M. T., Kahler, A. L., Allard, R. W., 1978 — Estimation of Life Cycle Components of Selection in an Experimental Plant Population. *Genetics* Vol. 89 pp. 765-792.
- Coelho, I. S., 2003 — Propriedade da terra e política florestal em Portugal. *Silva Lusitana* Vol. 11 pp. 185-199.
- Collada, C., Jiménez, P., Gil, L., 2002? — Análisis de la variabilidad de ADN de cloroplastos en *Quercus ilex* L., *Q. suber* L., y *Q. coccifera* L. *Actas del III Congreso Forestal Español*. Granada, 25-28 septiembre 2001.
- Corcuera, L., Camarero, J. J., Gil-Pelegrín, E., 2002 — Functional groups in *Quercus* species derived from the analysis of pressure-volume curves. *Trees* Vol. 16 pp. 465-472.
- Cottrell, J. E., Munro, R. C., Tabbener, H. E., Milner, A. D., Forrest, G. I., Lowe, A. J., 2003 — Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oakwoods differing in population history. *For. Ecol. Man.* Vol. 176 pp. 287-303.
- Coutinho, A. X. P., 1888 — Os *Quercus* de Portugal. *Bol. Soc. Brot.* Vol. 6 pp. 47-114.
- Coutinho, A. X. P., 1935 — Suplemento da Flora de Portugal. (Plantas vasculares). *Bol. Soc. Brot.* (II) Vol. 10 pp. 43-194.
- Craft, K., Ashley, M. V., Koenig, W. D., 2002 — Limited Hybridization Between *Quercus lobata* and *Quercus douglasii* (Fagaceae) in a Mixed Stand in Central Coastal California. *Am. J. Bot.* Vol. 89 pp. 1792-1798.
- Crick, F. H. C., 1958 — On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* Vol. 12 pp. 138-163.
- Cristofolini G. and Crema S. 2005. A morphometric study of the *Quercus crenata* species complex (Fagaceae). *Bot. Helv.* Vol. 115 pp. 155-167.
- Darwin, C., 1872 — *The Origin of Species*, 6^a ed.. John Murray, London.
- Davenport, H. A., 1960 — Histochemistry: Enzymes. In: *Histological and Histochemical Techniques*. W. B. Saunders Co. Cap. 19.
- Delfine, S., Csiky, O., Seufert, G., Loreto, F., 2000 — Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*): monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. *New Phytol.* Vol. 146 pp. 27-36.
- Demesure, B., Sodji, N., Petit, R. J., 1995 — A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* Vol. 4 pp. 129-131.
- DeWoody, Y. D., DeWoody, J. A., 2005 — On the Estimation of Genome-wide Heterozygosity Using Molecular Markers. *J. Hered.* Vol. 96 pp. 85-88.
- DGF, 2003 — *Inventário Florestal*, 3^o revisão. Dir. Geral das Florestas, Lisboa.
- Díaz-Fernández, P. M., Climent J., Gil, L. 2004 — Biennial acorn maturation and its relationship with flowering phenology in Iberian populations of *Quercus suber*. *Trees* Vol. 18 pp. 615-621.

- DiStefano, S., Palma, J. M., Gómez, M., Río, L. A., 1997 — Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. *Biochem. J.* Vol. 327 pp. 399–405.
- Dobzhansky, T., Ayala, F., Stebbins, G., e Valentine, J., 1977 — *Evolution*. Freeman & Co.
- Dodd, R. S., Kashani, N., Afzal-Rafii, Z., 2002 — Population diversity and evidence of introgression among the black oaks of California. In: *Proceedings of the Fifth Symposium on Oak Woodlands: Oak Woodlands in California's Changing Landscape, 2001, October 22-25, San Diego, CA.* (Techn. Coord. R. B. Standiford, D. McCreary, K. L. Purcell). USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-184, pp. 775–785.
- Dodd, R. S., Hüberli, D., Douhovnikoff, V., Harnik, T. Y., Afzal-Rafii, Z., Garbelotto, M., 2005 — Is variation in susceptibility to *Phytophthora ramorum* correlated with population genetic structure in coast live oak (*Quercus agrifolia*)? *New Phytol.* Vol. 165 pp. 203–214.
- Dow, B., Ashley, M. V., 1997 — Population structure and mating system of bur oak, *Quercus macrocarpa*, characterized by DNA microsatellite analysis. In: *Diversity and Adaptation in Oak Species.* (Ed. K. C. Steiner) Proceedings of the second meeting of Working Party 2.0.8.05, Genetics of *Quercus*, of the International Union of Forest Research Organizations, October 12–17, 1997. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. pp. 1–8.
- Ducousso, A., Michaud, H. & Lumaret, R. 1993 — Mating system and gene flow in the genus *Quercus*. *Ann. Sci. For.*, Vol. 50 (Suppl. 1) pp.91–106.
- Dumolin-Lapègue, S., Demesure, B., Fineschi, S., Le Corre, V., Petit, R. J., 1997a — Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* Vol. 146 pp. 1475–1487.
- Dumolin-Lapègue, S., Pemonge, M.-N., Petit, R. J., 1997b — An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Mol. Ecol.* Vol. 6 pp. 393–397.
- Dupouey, J. L., Badeau, V., 1993 — Morphological variability of oaks (*Quercus robur* L, *Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Quercus pubescens* Willd) in northeastern France: preliminary results. *Ann. Sci. For.* Vol. 50 (Supl. 1) pp. 35s–40s.
- Dutech, C., Sork, V. L., Irwin, A. J., Smouse, P. E., Davis, F. W., 2005 — . Gene Flow and Fine-scale Genetic Structure in a Wind-pollinated Tree Species, *Quercus lobata* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* Vol. 92 pp. 252–261.
- Dzialuk, A., Chybicki, I., Burczyk, J., 2005 — PCR Multiplexing of Nuclear Microsatellite Loci in *Quercus* Species. *Plant Mol. Biol. Rep.* Vol. 23 pp. 121–128.
- Elena-Rosellò, J. A., Lumaret, R., Cabrera, R., Michaud, H., 1992 — Evidence for hybridization between sympatric holm-oak and cork-oak in Spain based on diagnostic enzyme markers. *Vegetatio* Vol. 99–100 pp. 115–118.
- Elena-Rosellò, J. A., Cabrera, E., 1996 — Isozyme Variation in Natural Populations of Cork-Oak (*Quercus suber* L.). Population Structure, Diversity, Differentiation and Gene Flow. *Silvae Genet.* Vol. 45 pp. 229–235.
- Elena-Rosellò, J. A., Río, J. M., Valdecantos, J. L. C., Santamaria, I. C., 1993 — Ecological aspects of the floral phenology of the cork oak (*Q. suber* L): why do annual and biennial biotypes appear? *Ann. Sci. For.* Vol. 50 (Supl. 1) pp. 114s–121s.
- Elena-Rosellò, J. A., SantaMaria, I. G., Cardiel, P. J. C., 1997 — Variabilidad genética (isoenzimática) en poblaciones mixtas de *Quercus suber* L. y *Q. rotundifolia* Lam.: Evidencia de introgresión. *European Conference on Cork Oak and Cork*. ed. H. Pereira, pp. 229–236.
- Falconer, D. S., Mackay, T. F. C., 1996 — *Introduction to Quantitative Genetics* 4th Edition. Longman Inc..
- Fernández-M., J. F., Sork, V. L., 2005 — Mating Patterns of a Subdivided Population of the Andean Oak (*Quercus humboldtii* Bonpl., Fagaceae). *J. Hered.* Vol. 96 pp. 635–643.
- Ferreira, A., Lopes, F., Pereira, H., 2000 - Caractérisation de la croissance et de la qualité du liège dans une région de production. *Ann. Sci. For.* Vol. 57 pp. 187–193.
- Fine, I. H., Costello, L. A., 1963 — The use of starch gel electrophoresis in dehydrogenase studies. *Meth. Enzymol.* Vol. 6 pp. 958–972
- Fineschi, S., Turchini, D., Villani, F., Vendramin, G. G., 2000 — Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries. *Mol. Ecol.* Vol. 9 pp. 1495–1503.
- Finkeldey, R., Mátyás, G., 2003 — Genetic variation of oaks (*Quercus* spp.) in Switzerland. 3. Lack of impact of postglacial recolonization history on nuclear gene loci. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 106 pp. 346–352.
- Fisher, R. A., 1958 — *The Genetical Theory of Natural Selection*, 2nd Ed.. Dover.
- Franco, J. A., 1990 — *Quercus* L.. In: *Flora Iberica*, Vol. II (Platanaceae – Plumbaginaceae [partim]). (Ed. S. Castroviejo et al.). pp. 15–36. Real Jardín Botánico, CSIC.
- Fuerst, P. A., Chakraborty, R., Nei, M., 1977 — Statistical studies on protein polymorphism in natural populations. I. Distribution of single locus heterozygosity. *Genetics* Vol. 86 pp. 455–483.
- Gabriel, O., 1971 — Locating enzymes on gels. *Meth. Enzymol.* Vol. 22 pp. 578–604
- Gabriel, O., Gersten, D. M., 1992 — Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis, I. *Anal. Biochem.* Vol. 203 pp. 1–21.
- Galliano, E. F., 1987 — Fagaceae. In: *Flora Vascular de Andalucía Occidental*, Vol. 1. (Ed. B. Valdés, S. Talavera, E. Fernández-Galliano). Cap. 38. Ketres Editora, S. A., Barcelona.
- Ganzi, G. C., 1984 — Preparation of high-purity laboratory water. *Meth. Enzymol.* Vol. 104 pp. 391–403
- Gehle, T., 1999 — Genetische Differenzierung der Eiche (*Quercus robur*) in Nordrhein-Westfalen. *Allg. Forst- u. J.-Ztg.* Vol. 170 pp. 183–188.
- Gekko, K., Timasheff, S. N., 1981 — Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* Vol. 20 pp. 4677–4686.
- Girão, A. A., 1942 — Distribuição antiga do sobreiro em Portugal. *Bol. Junta Nac. Cortiça* n° 44 pp. 5–7.
- Goldstein, D. B., Linares, A. R., Cavalli-Sforza, L. L., Feldman, M. W., 1995 — An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* Vol. 139 pp. 463–471.
- Goldstein, J. L., Swain, T., 1965 — The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* Vol. 4 pp. 185–92.
- Gómez-Casero, M. T., Hidalgo, P. J., García-Mozo, H., Domínguez, E., Galán, C., 2004 — Pollen biology in four Mediterranean *Quercus* species. *Grana* Vol. 43 pp. 22–30.

- González-Adrados, J. R., Lopes, F., Pereira, H., 2000 — Quality grading of cork plants with classification models based on defect characterization. *Holz als Roh- und Werkstoff* Vol. 58 pp. 39-45.
- González-Rodríguez, A., Arias, D. M., Valencia, S., Oyama, K., 2004a — Morphological and RAPD Analysis of Hybridization Between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), Two Mexican Red Oaks. *Am. J. Bot.* Vol. 91 pp. 401-409.
- González-Rodríguez, A., Bain, J. F., Golden, J. L., Oyama K., 2004b — Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis*-*Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Mol. Ecol.* Vol. 13 pp. 3467-3476.
- González-Rodríguez, A., Oyama, K., 2005 — Leaf morphometric variation in *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two hybridizing Mexican red oaks. *Bot. J. Linn. Soc.* Vol. 147 pp. 427-435.
- Gottlieb, L. D., 1982 — Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* Vol. 216 pp. 373-80
- Govaerts, R., Frodin, D. G., 1998 — *World checklist and bibliography of Fagales* (Betulaceae, Corylaceae, Fagaceae and Ticodendraceae). Royal Botanic Gardens, Kew. (<http://www.kew.org/wcsp/advanced.do> para uma lista completa para o género *Quercus*)
- Gram, W. K., Sork, V. L., 2001 — Association between environmental and genetic heterogeneity in forest tree populations. *Ecology* Vol. 82 pp. 2012-2021.
- Grivet, D., Smouse, P. E., Sork, V. L., 2005 — A novel approach to an old problem: tracking dispersed seeds. *Mol. Ecol.* Vol. 14 pp. 3585-3595.
- Hamrick, J. L., 1979 — Genetic variation and longevity. In: *Topics in Plant Population Biology*. (ed. O. Sulbrig, S. Jain, G. Johnson, P. Raven). Columbia Univ. Press. pp. 84-113.
- Hamrick, J. L., Linhart, Y. B., Mitton, J. B., 1979 — Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* Vol. 10 pp. 173-200.
- Hamrick, J. L., 1982 — Plant population genetics and evolution. *Am. J. Bot.* Vol. 69 pp. 1685-1693.
- Harrison, G. A., Tanner, J. M., Pilbeam, D. R., Baker, P. T., 1988 — *Human Biology*, 3rd Ed.. Oxford University Press.
- Hattermer, H. H., 1991 — Measuring genetic variation. In: *Genetic Variation in European Populations of Forest Trees*. (Eds. G. Müller-Starck, M. Ziehe). J. D. Sauerländer, Frankfurt. pp. 2-19.
- Heckenberger, M., van der Voort, J. R., Melchinger, A. E., Peleman, J., Bohn M., 2003 — Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties: II. Genetic and technical sources of variation in AFLP data and comparison with SSR data. *Mol. Breed.* Vol. 12 pp. 97-106.
- Heeb, M. J., Gabriel, O., 1984 — Enzyme localization in gels. *Meth. Enzymol.* Vol. 104 pp. 416-39.
- Hélandot, J.-L., sem data — *La Page des Chênes*. http://jeanlouis.helardot.free.fr/page_chenes/chene_accueil.html
- Henikoff, S., Henikoff, J. G., 1992 — Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 89 pp. 10915-10919.
- Hertel, H., Zarpel, I., 1996 — Investigation on vitality and genetic structure in oak stands. *Ann. Sci. For* Vol. 53 pp. 761-773.
- Herzog, S., 1996 — Genetic inventory of European oak populations: consequences for breeding and gene conservation. *Ann. Sci. For.* Vol. 53 pp. 783-793.
- Herzog, S., Kriebel, D., 1999 — Genetic structures of a flooded and a non-flooded oak (*Quercus robur*) population from the floodplains of the Rhein river. *Ekologia* (Bratislava) Vol. 18 (Suppl. 1) pp. 160-163.
- Hewitt, G. M., 1999 — Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc. (Molecular genetics in animal ecology)*, ed. P. A. Racey, P. J. Bacon, J. F. Dallas, S. B. Pierney) Vol. 68 pp. 87-112.
- Hill, R., Lorch, W., 1981 — Ion exchange. In: *Handbook of Water Purification* Ed.: Walter Lorch. McGraw-Hill Book Co. (UK) Ltd., London. Ch. 7.
- Himrane, H., Camarero, J. J., Gil-Pelegrín, E., 2004 — Morphological and ecophysiological variation of the hybrid oak *Quercus subpyrenaica* (*Q. faginea* × *Q. pubescens*). *Trees* 18: 566-575
- Hjelmeland, L. M., 1980 — A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 77 pp. 6368-70
- Hornero, J., Gallego, F. J., Martínez, I., Toribio, M., 2001 — Testing the conservation of *Quercus* spp. microsatellites in the cork oak, *Q. suber* L.. *Silvae Genet.* Vol. 50 pp. 162-167.
- Hubby, J. L., Lewontin, R. C., 1966 — A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* Vol. 54 pp. 577-594.
- Huxel, G. R., 1999 — Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biol. Conserv.* Vol. 89 pp. 143-152.
- Ingram, V. M., 1957 — Gene mutations in human Hemoglobin: the chemical difference between normal and sickle-cell hemoglobin. *Nature* Vol. 180 pp. 326-328.
- International SNP Map Working Group, 2001 — A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* Vol. 409 pp. 928-933.
- Isagi, Y., 1997 — Analysis of the regeneration process of an evergreen oak, *Quercus myrsinifolia*, using microsatellite markers. In: *Diversity and Adaptation in Oak Species*. (Ed. K. C. Steiner) Proceedings of the second meeting of Working Party 2.0.8.05, Genetics of *Quercus*, of the International Union of Forest Research Organizations, October 12-17, 1997. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. p. 49.
- Jensen, J. S., Olrik, D. C., Siegismond, H. R., Lowe, A. J., 2003 — Population genetics and spatial autocorrelation in an unmanaged stand of *Quercus petraea* in Denmark. *Scand. J. For. Res.* Vol. 18 pp. 295-304.
- Jiggins, C. D., Mallet, J., 2000 — Bimodal hybrid zones and speciation. *TREE* vol. 15 pp. 250-255.
- Jiménez, P., Agúndez, D., Alía, R., Gil, L., 1999 — Genetic variation in central and marginal populations of *Quercus suber* L.. *Silvae Genet.* Vol. 48 pp. 278-284.
- Jiménez, P., 2001 — *Análisis de la variabilidad genética de Quercus suber L. mediante marcadores moleculares y su*

- aplicación a la conservación de recursos genéticos*. Tesis doctoral, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio de Ciencia Y Tecnología, Madrid.
- Jiménez, P., Gil, L., 2001 — Spain (country report). In: *Mediterranean Oaks Network, Report of the first meeting, 12-14 October 2000, Antalya, Turkey* (S. Borelli, M. C. Varela, eds.), pp. 57-62. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Jiménez, P., Heredia, U. L., Collada, C., Lorenzo, Z., Gil, L., 2004 — High variability of chloroplast DNA in three Mediterranean evergreen oaks indicates complex evolutionary history. *Heredity* Vol. 93 pp. 510-515.
- Johnson, G. B., 1974 — Enzyme polymorphism and metabolism. *Science* Vol. 184 pp. 28-37.
- Johnson, G. B., 1979 — Enzyme polymorphism: genetic variation in the physiological phenotype. In: *Topics in Plant Population Biology*. (ed. O. Sulbrig, S. Jain, G. Johnson, P. Raven). Columbia Univ. Press. pp. 62-83.
- Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., Karp, A., 1997 — Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* Vol. 3 pp. 381-390.
- Jonsson, A., Eriksson, G., 1989 — Hybridization and performance of hybrids. Artificial hybridization. In: Dept. Forest Genetics, Research Notes 43, Uppsala. pp. 8-12.
- Kanazashi, A., Yoshimaru, H., Kawahara, T., 1997a — Very small differentiation among local populations of Japanese white oaks. In: *Diversity and Adaptation in Oak Species*. (Ed. K. C. Steiner) Proceedings of the second meeting of Working Party 2.0.8.05, Genetics of *Quercus*, of the International Union of Forest Research Organizations, October 12-17, 1997. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. p. 147.
- Kanazashi, A., Kanazashi, T., Kawahara, T., 1997b — Evidence of reproductive barriers between closely related species of *Quercus*. In: *Diversity and Adaptation in Oak Species*. (Ed. K. C. Steiner) Proceedings of the second meeting of Working Party 2.0.8.05, Genetics of *Quercus*, of the International Union of Forest Research Organizations, October 12-17, 1997. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. p. 243.
- Kanazashi, T., Kanazashi, A., 1997 — Premature abscission of fruits in *Quercus serrata*, a common deciduous oak in Japan: in what stagem, how many, and why?. In: *Diversity and Adaptation in Oak Species*. (Ed. K. C. Steiner) Proceedings of the second meeting of Working Party 2.0.8.05, Genetics of *Quercus*, of the International Union of Forest Research Organizations, October 12-17, 1997. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. pp. 247-248.
- Kashani, N., Dodd, R. S., 2002 — Genetic differentiation of two California red oak species, *Quercus parvula* var. *shrevei* and *Q. wislizeni*, based on AFLP genetic markers. In: *Proceedings of the Fifth Symposium on Oak Woodlands: Oak Woodlands in California's Changing Landscape, 2001, October 22-25, San Diego, CA*. (Techn. Coord. R. B. Standiford, D. McCreary, K. L. Purcell). USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-184, pp. 417-426.
- Kelleher, C. T., Kelly, D., L., Hodkinson, T. R., 2004 — Species status, hybridisation and geographic distribution of Irish populations of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.. *Watsonia* Vol. 25 pp. 83-97.
- Kelleher, C. T., Hodkinson, T. R., Douglas, G. C., Kelly, D., L., 2005 — Species Distinction in Irish Populations of *Quercus petraea* and *Q. robur*: Morphological versus Molecular Analyses. *Ann. Bot.* Vol. 96 pp. 1237-1246.
- Kelley, W. A., Adams, R. P., 1977 — Preparation of extracts from juniper leaves for electrophoresis. *Phytochemistry* Vol. 16 pp. 513-6.
- Kephart, S. R., 1990 — Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Am. J. Bot.* Vol. 77 pp. 693-712.
- Khorana, H. G., Büchi, H., Ghosh, H., Gupta, N., Jacob, T. M., Kössel, H., Morgan, R., Narang, S. A., Ohtsuka, E., Wells, R. O., 1966 — Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* Vol. 31 pp. 39-49.
- Kimura, M., 1983 — *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press.
- Kimura, M., 1991 — Recent development of the neutral theory viewed from the Wrightian tradition of theoretical population genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88 pp. 5969-5973.
- King, J. L., 1967 — Continuously distributed factors affecting fitness. *Genetics* Vol. 55 pp. 483-492.
- Kleinschmit, J., 1993 — Intraspecific variation of growth and adaptive traits in European oak species. *Ann. Sci. For.* Vol. 50 (Suppl. 1) pp. 166s-185s.
- Kleinschmit, J., Kleinschmit, J. G. R., 2000 — *Quercus robur* - *Quercus petraea*: a critical review of the species concept. *Glasnik Za Šumske Pokuše (Annales, Experimentis Silvarum Culturae Provehendis)* Vol. 37 pp. 441-452.
- Kremer, A., Petit R. J., 1993 — Gene diversity in natural populations of oak species. *Ann. Sci. For.* Vol. 50 (Suppl. 1) pp. 186-202.
- Kremer, A., Zanetto A., Ducousso A., 1997 — Multilocus and multitrait measures of differentiation for gene markers and phenotypic traits. *Genetics* Vol. 145 pp. 1229-1241.
- Kremer, A., Dupouey, J. L., Deans, J. D., Cottrell, J., Csaikl, U., Finkeldey, R., Espinel, S., Jensen, J., Kleinschmit, J., Van Dam, B., Ducousso, A., Forrest, I., Heredia, U. L., Lowe, A. J., Tutkova, M., Munro, R. C., Steinhoff, S., Badeau, V., 2002 — Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands. *Ann. Sci. For.* Vol. 59 pp. 777 - 787.
- Kriebel, H. B., 1993 — Intraspecific variation of growth and adaptive traits in North American oak species. *Ann. Sci. For.* Vol. 50 (Suppl. 1) pp. 153s-165s.
- Kristjansson, F. K., 1963 — Genetic control of two pre-albumins in pigs. *Genetics* Vol. 48 pp. 1059-1063.
- Krungskrai, J., Cerami, A., Henderson, G. B., 1990 — Pyrimidine biosynthesis in parasite protozoa: purification of a monofunctional dihydroorotase from *Plasmodium berghei* and *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* Vol. 29 pp. 6270-5.
- Krüßmann, G., 1978 — *Handbuch der Laubgehölze*, vol 3. Paul Parey, Berlin

- Lawrence, G. H. M., 1951 — *Taxonomy of Vascular Plants*, Vol. I, cap. VIII. Trad. portuguesa de M. S. Teles Antunes, 1973, Fund. Calouste Gulbenkian.
- Lehninger, A. L., 1975 — *Biochemistry*, 2nd Ed.. Worth, New York.
- Lewontin, R. C., Hubby, J. L., 1966 — A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* Vol. 54 pp. 595-609
- Lewontin, R. C., 1973 — Population genetics. *Ann. Rev. Genet.* Vol. 7 pp. 1-17
- Lewontin, R. C., 1982 — *Human diversity*. Scientific American Books. Cap. 3.
- Lewontin, R. C., 1985 — Adaptação. In: *Enciclopédia Einaudi*, Vol. 6: *Orgânico – Inorgânico – Evolução*, pp. 217-233. Imprensa Nacional Casa da Moeda.
- Lexer, C., Heize, B., Steinkellner, H., Kampfer, S., Ziegenhagen, B., Glössl, J., 1999 — Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contaminations and inference of the seed parents from the offspring. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 99 pp. 185-191.
- Lexer, C., Heinze, B., Gerber, S., Macalka-Kampfer, S., Steinkellner, H., Kremer, A., Glössl, J., 2000 — Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: II. inferring the number of pollen donors from the offspring. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 100 pp. 858-865.
- Liebholt, A., Sork, V., Peltonen, M., Koenig, W., Bjørnstad, O. N., Westfall, R., Elkinton, J., Knops, J. M. H., 2004 — Within-population spatial synchrony in mast seeding of North American oaks. *Oikos* Vol. 104 pp. 156-164.
- Liu, F., Charlesworth, D., Kreitman, M., 1999 — The Effect of Mating System Differences on Nucleotide Diversity at the Phosphoglucose Isomerase Locus in the Plant Genus *Leavenworthia*. *Genetics* Vol. 151 pp. 343-357.
- Lomholt, B., 1975 — Phosphohydrolases: inorganic phosphate reaction giving stably stained zymograms using an alternative to benzidine. *Anal. Biochem.* Vol. 65 pp. 569-572
- Loomis, W. D., Battaile, J., 1966 — Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* Vol. 5 pp. 423-38
- Loomis, W. D., 1974 — Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Meth. Enzymol.* Vol. 31 pp. 528-44
- Loreto, F., Ciccioli, P., Brancaleoni, E., Valentini, R., De Lillis, M., Csiky, O., Seufert, G., 1998 — A hypothesis on the evolution of isoprenoid emission by oaks based on the correlation between emission type and *Quercus* taxonomy. *Oecologia* Vol. 115 pp. 302-305
- Lumaret, R., Tryphon-Dionnet, M., Michaud, H., Sanuy, A., Ipotesi, E., Born C., Mir, C., 2005 — Phylogeographical Variation of Chloroplast DNA in Cork Oak (*Quercus suber*). *Ann. Bot.* Vol. 96 pp. 853-861.
- M'Hirit, O., 1999 — Mediterranean forests: ecological space and economic and community wealth. *Unasylva* Vol. 50 pp. 3-15.
- Machado, C., Carrilho, A. C. M., Marques, A. F., Acácio, V., 2003 — *O sobreiro. Caderno técnico*. Federação dos Produtores Florestais de Portugal.
- Maehara, Y., Oda, S., Sugimachi, K., 2001 — The instability within: problems in current analyses of microsatellite instability. *Mutation Res.* Vol. 461 pp. 249-263.
- Manos, P. S., Doyle, J. J., Nixon, K. C., 1999 — Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* Vol. 12 pp. 333-349.
- Manos, P. S., Zhou, Z.-K., Cannon, C. H., 2001 — Systematics of Fagaceae: phylogenetic tests of reproductive trait evolution. *Int. J. Plant Sci.* Vol. 162 pp. 1361-1379
- Mariette, S., Cottrell, J., Csaikl, U. M., Goikoechea, P., König, A., Lowe, A. J., Van Dam, B. C., Barreneche, T., Bodénès, C., Streiff, R., Burg, K., Groppe, K., Munro, R. C., Tabbener, H., Kremer, A., 2002 — Comparison of Levels of Genetic Diversity Detected with AFLP and Microsatellite Markers within and among Mixed *Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L. Stands. *Silvae Genet.* Vol. 51 pp. 72-79.
- Marshall, D. R., Jain, S. K., 1969 — Genetic polymorphism in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. *Nature* Vol. 221 pp. 276-8.
- May, B., 1991 — Starch gel electrophoresis of allozymes. in: *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*, ed. A. R. Hoelzel. pp. 1-27. Appendix A1 pp. 271-80
- Mayol, M., Rosselló, J. A., 2001 — Why Nuclear Ribosomal DNA Spacers (ITS) Tell Different Stories in *Quercus*. *Mol. Phyl. Evol.* Vol. 19, pp. 167-176.
- Mendes, A. M. S. C., 2002 — A economia do sector da cortiça em Portugal. Evolução das actividades de produção e de transformação ao longo dos séculos XIX e XX. Artigo apresentado no XXII Encontro da Associação Portuguesa de História Económica e Social, Universidade de Aveiro, 15 de Novembro de 2002, 268 pág. . (http://www.egi.ua.pt/xxiiaphes/Artigos/Américo_Mendes.pdf e <http://amendes.no.sapo.pt/AMendes-CV-Unpublished%20papers%20presented.html>).
- Micales, J. A., Bonde, M. R., Peterson, G. L., 1986 — The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon* Vol. 27 pp. 405-49.
- Michaud, H., Toumi, L., Lumaret, R., Li, T. X., Romane, F., di Giusto, F. 1995 — Effect of geographical discontinuity on genetic variation in *Quercus ilex* L. (holm oak). Evidence from enzyme polymorphism. *Heredity* Vol. 74 pp. 590-606.
- Mills, L. S., and F. W. Allendorf. 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conserv. Biol.* Vol. 10 pp. 1509-1519.
- Mir, C., Toumi, L., Jarne, P., Sarda, V., Di Giusto, F., Lumaret, R., 2006 — Endemic North African *Quercus afares* Pomel originates from hybridisation between two genetically very distant oak species (*Q. suber* L. and *Q. canariensis* Willd.): evidence from nuclear and cytoplasmic markers. *Heredity* Vol. 96 pp. 175-184.
- Mitton, J. B., Linhart, Y. B., Hamrick, J. L., Beckman, J. S., 1977 — Observations on the genetic structure and mating system of ponderosa pine in the Colorado forest range. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 51 pp. 5-13
- Mitton, J. B., Linhart, Y. B., Sturgeon, K. B., Hamrick, J. L., 1979 — Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. *J. Hered.* Vol. 70 pp. 86-9
- Mitton, J. B., 1993 — Theory and data pertinent to the

- relationship between heterozygosity and fitness. In: *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding. Theoretical and Empirical Perspectives*, (ed. N. W. Thornhill). Chapter 2. Univ. Chicago, Chicago & London.
- Mogensen, H. L., 1975 — Ovale abortion in *Quercus* (Fagaceae). *Amer. J. Bot.* Vol. 62 pp. 160-165.
- Morales, R., Vicente, J. A., Mera, A. G. 2005 — cpDNA evidence of introgressions in *Quercus* L. (Fagaceae). The influence of the phytotopographic position. *Flora* Vol. 200 pp. 222-228.
- Morré D.J., 1971 — Isolation of Golgi apparatus. *Meth. Enzymol.* Vol. 22 pp. 130-148.
- Muir, G., Schlötterer, C., 2005 — Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.). *Mol. Ecol.* Vol. 14 pp. 549-561.
- Müller-Starck, G., Herzog, S., Hattemer, H. H., 1993 — Intra- and interpopulational genetic variation in juvenile populations of *Quercus robur* L and *Quercus petraea* Liebl. *Ann. Sci. For.* Vol. 50 (Supl. 1) pp. 233s-244s.
- Nason, J. D., Ellstrand, N. C., Arnold, M. L., 1992 — Patterns of hybridization and introgression in populations of oaks, manzanitas, and irises. *Am. J. Bot.* Vol. 79 pp. 101-111.
- Nataraj, A. J., Olivos-Glander, I., Kusukawa, N., Highsmith, Jr., W. E., 1999 — Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* Vol. 20 pp. 1177-1185.
- Natividade, J. V., 1934 — Cortiças. Contribuição para o estudo do melhoramento da qualidade. *Public. Dir. Ger. Serv. Florest.* Vol. 1 pp. 1-143.
- Natividade, J. V., 1936 — Estudo histológico das peridermes do híbrido *Quercus ilex* × *suber*, P. Cout.. Nota III. In: *Esboço de uma flora lenhosa portuguesa* (ed. P. Coutinho). *Publ. Dir. Ger. Serv. Flor. Aquíc.* Vol. III, Livro I.
- Natividade, J. V., 1939 — O problema da qualidade da cortiça nos sobreiros do Norte do Tejo (I e II). *Bol. Junta Nac. Cortiça* N° 8-9 pp. 5-16.
- Natividade, J. V., 1947 — Os fundamentos científicos da cultura racional do sobreiro, parte I. *Bol. Junta Nac. Cortiça* N° 104 pp. 381-391.
- Natividade, J. V., 1950 — *Subericultura*. Ministério da Economia, Pescas e Alimentação, Direcção Geral das Florestas e Aquícolas, Lisboa.
- Nei, M., 1973 — Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 70 pp. 3321-3.
- Nei, M., 1987 — *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.
- Nei, M., 1997 — Molecular phylogeny and genetic diversity analysis. In: *Diversity and Adaptation in Oak Species*. (Ed. K. C. Steiner) Proceedings of the second meeting of Working Party 2.0.8.05, Genetics of *Quercus*, of the International Union of Forest Research Organizations, October 12-17, 1997. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. pp. 78-80.
- Neigel, J.E., 1997 — A comparison of alternative strategies for estimating dispersal and gene flow from genetic markers. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* Vol. 28 pp. 105-128.
- Neves, C. M. B., 1944 — Problemas suberícolas na zona pliocénica ao Sul do Tejo. *Bol. Junta Nac. Cortiça* (ano VI) n° 65 pp. 193-197 e n° 66 pp. 241-244.
- Nimmo, H. G., Nimmo, G. A., 1982 — A general method for the localization of enzymes that produce phosphate, pyrophosphate, or CO₂ after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* Vol. 121 pp. 17-22.
- Nixon, K. C., 1993 — Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Ann. Sci. For.* Vol. 50 (Supl. 1) pp. 25-34.
- Nóbrega, F., 1997 — O polimorfismo isoenzimático na caracterização do sobreiro. *Silva Lusitana* Vol. 5 pp. 29-58.
- Nogueira, C. D. S., 1978 — *Bases ecológicas para o combate às pragas dos motados de sobreiro e azinho*. Instituto dos Produtos Florestais, Lisboa.
- Okay, E. N., Duncan, E. J., Sirju-Charran, G., Sreenivasan, T. N., 1997 — *Phytophthora* Canker resistance in cacao: role of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase. *J. Phytopathol.* Vol. 145 pp. 295-9.
- Oliveira, P., Custódio, A. C., Branco, C., Reforço, I., Rodrigues, F., Varela, M. C., Meierrose, C., 2003 — Hybrids between cork oak and holm oak: Isoenzyme analysis. *For. Gen.* Vol. 10 pp. 283-297.
- Pauling, L., Itano S. A., Singer, S. J., Wells, I. C., 1949 — Sick-cell anemia, a molecular disease. *Science* Vol. 110 pp. 543-548.
- Pearse, A. G. E., 1968 — *Histochemistry. Theoretical and Applied*, 3rd Ed.. Vol. 1. Longman, Churchill Livingstone. cap. 14.
- Penefsky, H. S., Tzagoloff A., 1971 — Extraction of water-soluble enzymes and proteins from membranes. *Meth. Enzymol.* Vol. 22 pp. 204-219.
- Pereira, H., 1998 - O calibre e a porosidade como parâmetros da qualidade tecnológica da cortiça em prancha. *Rev. Flor.* Vol. 2 pp. 46-50.
- Petit, R. J., Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, R., Ducouso, A., Kremer, A., 1997 — Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94 pp. 9996-10001.
- Petit, R. J., Csaikl, U., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., van Dam, B., Deans, J. D., Glaz, I., Dumolin-Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Goicoechea, P. G., Jensen, J. S., König, A., Lowe, A. J., Madsen, S. F., Mátyás, G., Munro, R. C., Olalde, M., Pemonge, M.-H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., Ziegenhagen, B., Kremer, A., 2002 — Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *For. Ecol. Man.* Vol. 156 pp. 5-26.
- Petit, R. J., Bodénès, C., Ducouso, A., Roussel, G., Kremer, A., 2003 — Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytol.* Vol. 161 pp. 151-164.
- Pio, C. A., Silva, P.A., Cerqueira, M.A., Nunes, T.V., 2005 — Diurnal and seasonal emissions of volatile organic compounds from cork oak (*Quercus suber*) trees. *Atmospheric Environment* Vol. 39 pp. 1817-1827.
- Poly, W. J., 1997 — Nongenetic Variation, Genetic-Environmental Interactions and Altered Gene Expression. III. Posttranslational Modifications. *Comp. Biochem. Physiol. A* Vol. 118. pp. 551-572.
- Pons, O., Petit, R. J., 1996 — Measuring and testing genetic

- differentiation with ordered *versus* unordered alleles. *Genetics* Vol. 144 pp. 1237-1245.
- Raposo, J. H., s.d. — *Alentejo. Dos princípios à chamada reforma agrária*. O Século, Lisboa.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995 — GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* Vol. 86 pp. 248-249. Versão corrente é 3.4, disponível em <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>
- Rice, W. C., Hostert, E. E., 1993 — Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* Vol. 47 pp. 1637-1653.
- Rieseberg, L. H., 1997 — Hybrid origins of plant species. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* Vol. 28 pp. 359-389.
- Rieseberg, L. H., Linder, C. R., 1999 — Hybrid classification: insights from genetic map-based studies of experimental hybrids. *Ecology* Vol. 80 pp. 361-370.
- Ritland, K., 1990 — A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. *J. Hered.* Vol. 81 pp. 235-237.
- Rodford, A. E., Dickison, W. C., Massey, J. R., Bell, C. R., 1974 — *Vascular Plant Systematics*. pp. 217-218. Harper & Row, New York.
- Rothmaler, W., 1941 — Árvores de Portugal. *Bol. Soc. Brot.* (II) Vol. 15 pp. 123-148.
- Roughgarden, J., 1979 — The neutrality controversy, in *Theory of Population Genetics and Evolutionary Ecology: an Introduction*, chapter 6, pp. 81-97. MacMillan Publ. Co. Inc.
- Rushton, B. S., 1993 — Natural hybridization within the genus *Quercus* L. *Ann. Sci. For.* Vol. 50 (Supl. 1) pp. 73s-90s.
- Ryan, C. A., Walker-Simmons, M., 1981 — Plant proteinases. in *The Biochemistry of Plants, Vol. 6: Proteins and Nucleic Acids*, Ed. A. Marcus (P. K. Strumpf, E. E. Corn, eds.-in-chief). Academic Press. Cap. 8.
- Sadaka-Laulan, N., Ponge, J.-F., 2000 — Comparative leaf decomposition within the holm oak complex. *Eur. J. Soil Biol.* Vol. 36 pp. 91-95.
- Saintagne, C., Bodénès, C., Barreneche, T., Pot, D., Plomion, C., Kremer, A., 2004 — Distribution of genomic regions differentiating oak species assessed by QTL detection. *Heredity* Vol. 92 pp. 20-30.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989 — *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2^a Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory
- Sánchez, M. E., Andicoberry, S., Trapero, A., 2005 — Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. *For. Path.* Vol. 35 pp. 115-125.
- Sbay, H., 2001 — Morocco (country report). In: *Mediterranean Oaks Network, Report of the first meeting, 12-14 October 2000, Antalya, Turkey* (S. Borelli, M. C. Varela, eds.), pp. 48-51. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Scandalios, J. G., 1964 — Tissue-specific isozyme variations in maize. *J. Hered.* Vol. 55 pp. 281-285.
- Schnitzler, J.-P., Steinbrecher, R., Zimmer, I., Steigner, D. & Fladung, M., 2004 — Hybridization of European oaks (*Quercus ilex* × *Q. robur*) results in a mixed isoprenoid emitter type. *Plant Cell Environ.* Vol. 27 pp. 585-593.
- Schwarz, O., 1936 — Entwurf zu einem natürlichen System der Cupuliferen und der Gattung *Quercus*. *Notizbl. Bot. Gart. Mus. Berlin-Dahlem* 13: 1-22.
- Scotti-Saintagne, C., Mariette, S., Porth, I., Goicoechea, P. G., Barreneche, T., Bodénès, C., Burg, K., Kremer, A., 2004 — Genome Scanning for Interspecific Differentiation Between Two Closely Related Oak Species [*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.]. *Genetics* Vol. 168 pp. 1615-1626.
- Sedgley, M., Griffin, A., 1989 — *Sexual Reproduction of Tree Crops*. Academic Press, Harcourt Brace Javanivich Publishers, London
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., Whittam, T. S., 1986 — Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 51 pp. 873-84
- Shriver, M. D., Jin, L., Boerwinkle, E., Deka, R., Ferrell, R. E., Chakraborty, R., 1995 — A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 12 pp. 914-920.
- Siscart, D., Diego, V., Lloret, F., 1999 — Acorn ecology. In: *Ecology of Mediterranean Evergreen Oak Forests* (Ecological studies Vol. 137, eds. F. Rodà, J. Retama, C. A. Garcia, J. Bellot). Springer, Berlin. Cap. 6, pp. 75-87.
- Skopes, R. K., 1987 — *Protein purification. Principles and practices*, 2nd ed.. Springer Verlag.
- Slatkin, M., 1987 — Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* Vol. 236 pp. 787-792.
- Slatkin, M., 1995 — A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics* Vol. 139 pp. 457-462.
- Smithies, O. 1955 — Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* Vol. 61 pp. 629-641.
- Smouse, P. E., Dyer, R. J., Westfall R. D., Sork, V. L., 2001 — Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* Vol. 55 pp. 260-271.
- Smouse, P. A., Sork, V. L., 2004 — Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *For. Ecol. Man.* Vol. 197 pp. 21-38.
- Soltis, D. E., Haufler, C. H., Darrow, D. C., Gastony, G. J., 1983 — Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, and staining schedules. *Am. Fern J.* Vol. 73 pp. 9-27
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Chase, M. W., Mort, M. E., Albach, D. C., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W. H., Hoot, S. B., Fay, M. F., Axtell, M., Swensen, S. M., Prince, L. M., Kress, W. J., Nixon, K. C., Farris J. S., 2000 — Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcl*, and *atpB* sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* Vol. 133 pp. 381-461.
- Sork, V. L., Bramble, J., Sexton, O., 1993a — Ecology of mast-fruitletting in three species of North American deciduous oaks. *Ecology* Vol. 74 pp. 528-541.
- Sork, V. L., Huang, S., Wiener, E., 1993b — Macrogeographic and fine-scale genetic structure in a North American oak species, *Quercus rubra* L. *Ann. Sci. For.* Vol. 50 (Supl. 1) pp. 261s-270s.
- Sork, V. L., Nason, J., Campbell, D. R., Fernandez, J. F., 1999 — Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends Ecol. Evol.* Vol. 14 pp. 219-224.
- Soto, A., Lorenzo, Z., Gil, L., 2003 — Nuclear microsatellite markers for the identification of *Quercus ilex* L. and *Q. suber* L.

- hybrids. *Silvae Genet.* Vol. 52 pp. 63-66.
- Spencer, N., Hopkinson, D. A., Harris, H., 1964 — Phosphoglucumutase polymorphism in man. *Nature* Vol. 204 pp. 742-745.
- Staudt, M., Mir, C., Joffre, R., Rambal, S., Bonin, A., Landais D., Lumaret, R., 2004 — Isoprenoid emissions of *Quercus* spp. (*Q. suber* and *Q. ilex*) in mixed stands contrasting in interspecific genetic introgression. *New Phytol.* Vol. 163 pp. 573-584.
- Steinhoff, S., 1997 — Results of *Quercus* hybridization work from 1989-1996 at Escherode (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.). In: *Diversity and Adaptation in Oak Species*. (Ed. K. C. Steiner) Proceedings of the second meeting of Working Party 2.0.8.05, Genetics of *Quercus*, of the International Union of Forest Research Organizations, October 12-17, 1997. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. pp. 156-164.
- Streiff, R., Labbé, T., Bacilieri, R., Steinkellner, H., Glössl, J., Kremer, A., 1998 — Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Mol. Ecol.* 7: 317-328.
- Streiff, R., Ducouso, A., Lexer, C., Steinkellner, H., Gloessl, J., Kremer, A., 1999 — Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.. *Mol. Ecol.* Vol. 8 pp. 831-841.
- Sved, J. A., Reed, E., Bodmer, W. F., 1967 — The number of balanced polymorphism that can be maintained in a natural population. *Genetics* Vol. 55 pp. 469-481.
- Theimer, R. R., 1983 — Methods for plant tissues. In: *Methods of enzymatic analysis*, 3rd. ed., Vol. II: Samples, Reagents, Assessment of Results. (Ed. H. U. Bergmeier). Verlag Chemie Weinheim.
- Tomlinson, P. T., Jensen, R. J., Hancock, J. F., 2000 — Do whole tree silvic characters indicate hybridization in red oak (*Quercus* section *Lobatae*)? *Am. Midl. Nat.* Vol. 143 pp. 154-168.
- Toumi, L., Lumaret, R., 1998 — Allozyme variation in cork oak (*Quercus suber* L.): the role of phylogeography and genetic introgression by other Mediterranean oak species and human activities. *Theor. Appl. Genet.* 97 pp. 647-656
- Tutin, T. G. 1964 — *Quercus* L.. In: *Flora Europaea*, Vol. I (Lycopodiaceae to Platanaceae). (Ed. T. G. Tutin et al.). pp. 61-64. Cambridge Univ. Press.
- Uyenoyama, M. K., Zhang, Y., Newbigin, E., 2001 — On the origin of self-incompatibility haplotypes: transition through self-compatible intermediates. *Genetics* Vol. 157 pp. 1805-1817.
- Valbuena-Carabaña, M., González-Martínez, S. C., Sork, V. L., Collada, C., Soto, A., Goicoechea, P. G., Gil, L., 2005 — Gene flow and hybridisation in a mixed oak forest (*Quercus pyrenaica* Willd. and *Quercus petraea* (Matts.) Liebl.) in central Spain. *Heredity* Vol. 95 pp. 457-465.
- Van Valen, L., 1976 — Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* Vol. 25 pp. 233-239.
- Varela, M. C., 1995 — Hibridação entre o sobreiro e a azinheira? Implicações para os povoamentos produtores de semente de sobreiro. *Informação Florestal*, n°9- Abril/Junho. Ano III. Instituto Florestal. Lisboa.
- Varela, M.C., Valdivieso, T., 1996 — Phenological phases of *Quercus suber* L. flowering. *For. Genet.* Vol. 3 pp. 93-102.
- Varela, M. C., 1997 — Regions of provenance for cork oak in Portugal. In: *Quercus suber Network. Report of the third and fourth meetings, 9-12 June 1996, Sassari, Sardinia, Italy, and 20-22 February 1997, Almoraima, Spain*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp. 37-42.
- Varela, M. C., 2001 — The EUFORGEN *Quercus suber* Network and the research projects for the evaluation of genetic variability of cork oak. In: *Mediterranean Oaks Network. Report of the first meeting. 12-14 October 2000, Antalya, Turkey*. (Compil. S. Borelli, M. C. Varela). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp. 6-14.
- Varela, M. C. (ed.), 2003 — *Handbook of the Concerted Action "European network for the evaluation of genetic resources of cork oak for appropriate use in breeding and gene conservation strategies"*, FAIR 1 CT 95- 0202. Estação Florestal Nacional, Lisbon.
- Varela, M. C., Branco, T., Reforço Barros, I., Almeida, M. H., Chambel, M. R., 2003a — Nursery, raising and labelling of the material. In: *Handbook of the Concerted Action on Cork Oak FAIR 1 CT 95 0202*, M. C. Varela (ed.), Estação Florestal Nacional, Lisboa, 2003. cap. V, pp. 47-58.
- Varela, M. C., Muhs, H., Wuelisch, G., 2003b — Perspectives: Assessment of the trials; implications of the project for practical conservation and use of cork oak genetic resources. In: *Handbook of the Concerted Action on Cork Oak FAIR 1 CT 95 0202*, M. C. Varela (ed.), Estação Florestal Nacional, Lisboa, 2003. cap. IX, pp. 97-115.
- Vasconcelos, J. C., Franco, J. A., 1954 — Carvalhos de Portugal. *Anais Inst. Sup. Agron.* Vol. 21 pp. 1-135.
- Vásquez, F. J., 2002 — *Modelos preditivos de produção de cortiça e detecção precoce da qualidade*. Tese de doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Vásquez, F. M., 1998 — *Semillas del género Quercus L.. Biología, ecología y manejo*. Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico, Consejería de Agricultura y Comercio, Junta de Extremadura.
- Vekemans, X., Hardy, O. J., 2004 — New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol. Ecol.* Vol. 13 pp. 921-935.
- Vendramin, G. G., Anzidei, M., Madaghiele, A., Sperisen, C., Bucci, G., 2000 — Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* Vol. 43 pp. 68-78.
- Volis, S., Shulgina, I., Ward, D., Mendlinger, S., 2003 — Regional Subdivision in Wild Barley Allozyme Variation: Adaptive or Neutral? *J. Hered.* Vol. 94 pp. 341-351.
- Volis, S., Yakubov, B., Shulgina, I., Ward, D., Mendlinger, S., 2005 — Distinguishing adaptive from nonadaptive genetic differentiation: comparison of Q_{ST} and F_{ST} at two spatial scales. *Heredity* Vol. 95 pp. 466-475.
- Von Wühlisch, G., Muhs, H.-J., 1995 — Propagation by cuttings and identification by enzymes of some cork oak (*Quercus suber*) plus trees from Portugal. In: *Quercus suber network. Report of the first two meetings*. (Frison, E., Varela, M. C., Turok, J., compil.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome. pp. 27-31.
- Vos, R., Hoger, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Homes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M.,

- Zabeau, M., 1995 — A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* Vol. 23 pp. 4407-4414.
- Walter, R., Epperson, B. K., 2004 — Microsatellite Analysis of Spatial Structure Among Seedlings in Populations of *Pinus Strobus* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* Vol. 91 pp. 549-557.
- Wang, X.-R., Szmidt, A. E., Savolainen, O., 2001 — Genetic Composition and Diploid Hybrid Speciation of a High Mountain Pine, *Pinus densata*, Native to the Tibetan Plateau. *Genetics* Vol. 159 pp. 337-346.
- Watt, W. B., Cassin, R. C., Swan, M. S., 1983 — Adaptation at Specific Loci. III. Field Behavior And Survivorship Differences Among *Colias Pgi* Genotypes Are Predictable From *in vitro* Biochemistry. *Genetics* Vol. 103 pp. 725-739.
- Watt, W. B., 1992 — Eggs, enzymes, and evolution: Natural genetic variants change insect fecundity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 89, pp. 10608-10612.
- Weder, J. K. P., Kaiser, K.-P., 1995 — Fluorogenic substrates for hydrolase detection following electrophoresis. *J. Chromat. A* Vol. 698 pp. 181-201.
- Weir, B. S., Cockerham, C. C., 1984 — Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* Vol. 38 pp. 1358-1370.
- Werner, O., Rothe, G. M., Maurer, W. D., Tabel, U., 1997 — Genetic differentiation of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) stands in Rheinland Palatinate based upon RAPD markers. In: *Diversity and Adaptation in Oak Species*. (Ed. K. C. Steiner) Proceedings of the second meeting of Working Party 2.0.8.05, Genetics of *Quercus*, of the International Union of Forest Research Organizations, October 12-17, 1997. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. pp. 22-36.
- White, J. S., White, D. C., 1997 — *Source Book of Enzymes*. CRC Press, Boca Raton.
- Whittemore, A. T., Schaal, B. A., 1991 — Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88 pp. 2540-2544.
- Williams, J. H., Boecklen, W. J., Howard, D. J., 2001 — Reproductive processes in two oak (*Quercus*) contact zones with different levels of hybridization. *Heredity* Vol. 87 pp. 680-690.
- Wills, C., 1978 — Rank-order selection is capable of maintaining all genetic polymorphisms. *Genetics* Vol. 89 pp. 403-417.
- Wilson, P., 1992 — On inferring hybridity from morphological intermediacy. *Taxon* Vol. 41 pp. 11-23.
- Wolfe, A. D., Xiang, Q., Kephart, S. R., 1998 — Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol. Ecol.* Vol. 7 pp. 1107-1125.
- Worsfold, M., Marshall, M. J., Ellis, E. B., 1977 — Enzyme detection using phenazine methosulfate and tetrazolium salts: interference by oxygen. *Anal. Biochem.* 79 pp. 152-156
- Wright, S., 1965 — The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* Vol. 19 pp. 395-420.
- Wright, S., 1969 — *Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. 2: *The Theory of Gene Frequencies*. The University of Chicago Press, Chicago & London
- Yacine, A., Lumaret, R., 1989 — Genetic diversity in holm-oak (*Quercus ilex* L.): insight from several enzyme markers. *Silvae Genet.* 38 pp. 140-147
- Yacine, A., Bouras, F., 1997 — Self- and cross-pollination effects on pollen tube growth and seed set in holm oak *Quercus ilex* L. (Fagaceae). *Ann. Sci. For.* Vol. 54 pp. 447-462.
- Zanetto, A., Kremer, A., Labbe, T., 1993 — Differences of Zgenetic variation based on isozymes of the primary and secondary metabolism in *Quercus petraea*. *Ann. Sci. For.* Vol. 50 (Suppl. 1) pp. 245-252.
- Zanetto, A., Roussel, G., Kremer, A., 1994 — Geographic variation of interspecific differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *For. Gen.* Vol. 1 pp. 111-123.
- Ziehe, M., Müller-Starck, G., 1991 — Changes of genetic variation due to associated selection. In: *Genetic Variation in European Populations of Forest Trees*. (Eds. G. Müller-Starck, M. Ziehe). J. D. Sauerländer, Frankfurt. pp. 259-271.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994 — Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* Vol. 20 pp. 176-183.
- Zoldos, V., Siljak-Yakovlev, S., Papes, D., Sarr, A., Panaud, O., 2001 — Representational difference analysis reveals genomic differences between *Q. robur* and *Q. suber*: implications for the study of genome evolution in the genus *Quercus*. *Mol. Genet. Genom.* Vol. 265 pp. 234-41.