

Parte I: Taxonomia do género

Quercus

A — Enquadramento taxonómico

O género *Quercus* L., onde se incluem o sobreiro — *Q. suber* L. — e a azinheira — *Q. ilex* L. ssp. *rotundifolia* (Lam.) O. Schwz. ex Tab. Morais¹ — é classificado na família das Fagáceas (Angiospérmicas). O recente esquema taxonómico elaborado pelo *Angiosperm Phylogeny Group* [APG 1998, Soltis *et al.* 2000] propõe a seguinte hierarquia de níveis taxonómicos intermédios (evidencia-se em cada nível, com sublinhado, o grupo onde se incluem os *Quercus*):

Angiospermæ (clades supra-ordinais Monocotyledonæ, Eudicotyledonæ, ordens Ceratophyllales, Laurales, Piperales, Magnoliales, famílias Amborellaceæ, Nympheaceæ, Winteraceæ, etc.);

Eudicotyledonæ (clades supra-ordinais Asteridæ e Rosidæ, esta incluindo Eurosida I e II, ordens Geraniales, Caryophyllales, Santalales, Saxifragales, Proteales, Ranunculales, famílias Dilleniaceæ, Buxaceæ, etc.);

Eurosida I (ordens Cucurbitales, Fabales, Fagales, Malpighiales, Oxalidales, Rosales, família Celastraceæ, etc.);

Fagales Engl. (famílias Fagaceæ, Betulaceæ, Casuarinaceæ, Juglandaceæ, Myricaceæ, etc.);

Descrições

Fagaceæ: árvores, raramente arbustos, monóicos, anemófilos ou mais raramente entomófilos; folhas simples, alternas, pecioladas, peninérvias, com estípulas caducas; flores masculinas formando amentos mais ou menos alongados, perianto sepalóide dividido em 4–6 lóbulos, (4)6–20(40) estames; flores femininas solitárias ou em grupos de 2 ou 3, rodeadas por um invólucro basal de que deriva a cúpula do fruto, perianto dividido em 4–6 lóbulos, ovário ínfero geralmente trilocular, com 2 rudimentos seminais por lóculo, 3 ou 6 estiletos (às vezes com 6 ou 9 lóculos e 6 a 9 estiletos); frutos em aquénio, de pericarpo coriáceo, solitários ou em grupos de 2 ou 3, rodeados por uma cúpula acrescente [Tutin 1964, Franco 1990];

¹ Pode encontrar-se no apêndice II, secção F, uma discussão sobre a nomenclatura da azinheira predominante em Portugal.

Quercus L.: flores masculinas formando amentos longos e pendentes; inflorescências femininas posicionadas separadamente dos amentos; fruto contendo 1 aquénio oblongo ou elipsóide de germinação hipógea, cúpula escamosa abarcando somente a base do aquénio, formando como que um dedal; gemas ovóides [Tutin 1964, Galliano 1987, Franco 1990, Nixon 1993].

Outros géneros de fagáceas representadas na Europa e Bacia Mediterrânica são *Fagus* L. (faias) e *Castanea* Mill. (castanheiros).

1) Subdivisões do género *Quercus*

A taxonomia infragenérica dos *Quercus* tem relevância para o estudo dos híbridos entre sobreiro e azinheira sob dois pontos de vista: por um lado, porque os caracteres diagnosticantes de cada grupo subgenérico são úteis na compilação de caracteres diagnosticantes entre as duas espécies e os seus híbridos, a qual será tratada na secção C1 da III parte; por outro, pela relação que tem o nível hierárquico da separação entre as duas espécies e a plausibilidade da ocorrência de híbridos, que no esquema taxonómico adoptado pela *Flora Europæa* [Tutin 1964] não “devem” ocorrer.

A literatura europeia referencia-se geralmente ao esquema adoptado pela *Flora Europæa* [Tutin 1964], proposto por O. Schwarz [1936]. Nele se consideram 3 subgéneros autóctones para a Europa e 1 exótico (*Erythrobalanus*) (figura 2.1a), mas está longe de considerar o género no seu todo, e a literatura norte-americana ignora-o. Como comparação, no esquema proposto por Krüssmann com base no sistema de K. Prantl para toda a espécie [Krüssmann 1978, Kleinschmit 1993], as espécies europeias pertencem a um só subgénero, *Lepidobalanus* (figura 2.1b).

Mais recentemente, as análises cladísticas de Nixon contemplaram apenas 2 subgéneros, *Cyclobalanopsis* e *Quercus*, neste separando-se três secções (*Quercus* = *Lepidobalanus*, onde os grupos *Ilex* e *Cerris-Suber* poderiam formar uma subsecção à parte, *Lobatae* = *Erythrobalanus* e *Protobalanus* só de espécies americanas) [Nixon 1993, Borgardt & Pigg 1999], mas com base na variação molecular [Manos et al., 1999, 2001] esse esquema também não será o mais adequado, pois os subgéneros *Cerris* e *Schlerophyllodrys* da *Flora Europæa* constituiriam uma ramificação provavelmente tão precoce como os *Cyclobalanopsis* (figura 2.2, Apêndice II secção A).

Segundo os resultados de Manos et al. [2001] com as sequências dos ITS (*internal transcribed spacers*) do rDNA, a divergência entre sobreiro e azinheira é cerca de 50% superior à que os separa dos táxones mais

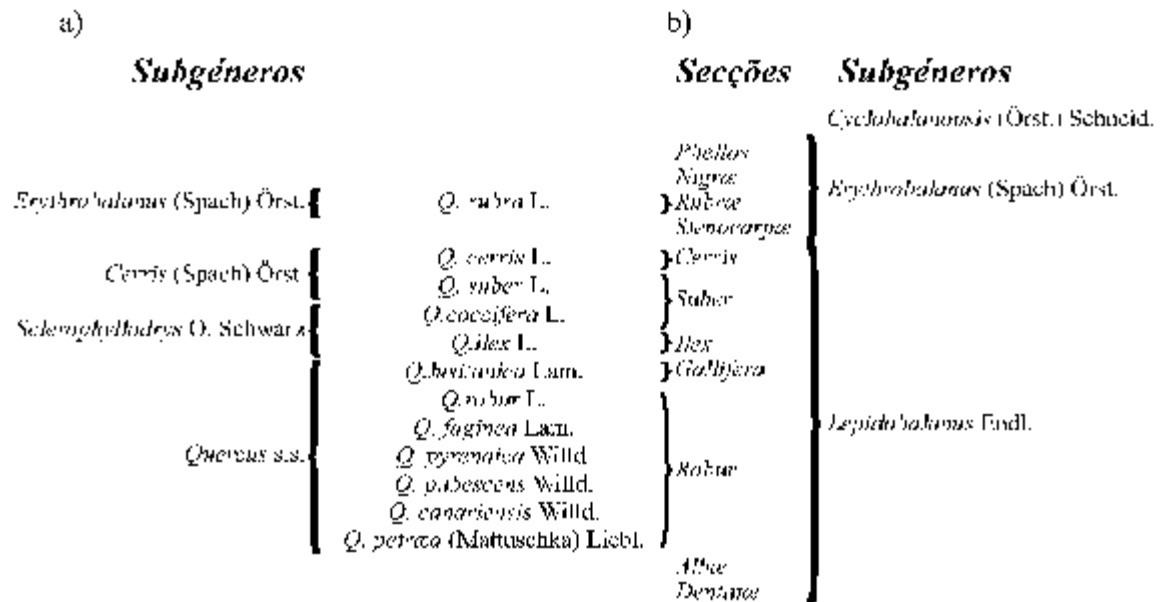


Figura 2.1 — Exemplos da subdivisão do género *Quercus* em categorias supra-específicas, ilustrando a classificação nessas categorias das espécies ibéricas (autóctones excepto no caso de *Q. rubra* L. e *Q. cerris* L.). a) Esquema adoptado pela *Flora Europaea*. b) Esquema proposto por Krüssmann.

aparentados com cada um (*Q. cerris* e *Q. coccifera*, respectivamente), aproximadamente a mesma que separa *Q. robur* (carvalho roble) de *Q. alba* L., e menos de 60% da que separa o sobreiro do roble. Assim, em termos filogenéticos, o sobreiro não será um parente muito afastado da azinheira dentro do género *Quercus*, mas também não se conta entre os exemplos de maior proximidade. Por outro lado, o estudo da mesma região cromossómica num pequeno conjunto de espécies europeias,

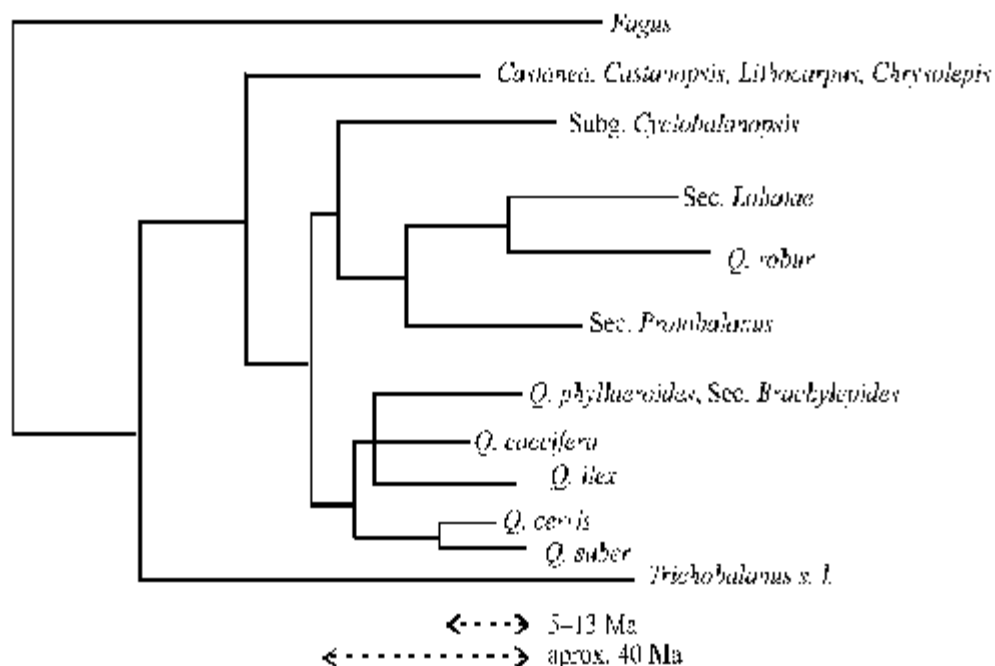


Figura 2.2 — Esquema da filogenia das Fagáceas baseada na análise das sequências das regiões ITS de rDNA, simplificado a partir de Manos *et al.* [2001]. Usando como referência *Q. suber*, ilustram-se 2 critérios de calibração do tempo geológico para estes dados (Ma, milhões de anos).

utilizando modelação da estrutura secundária dos transcritos (primariamente para aperfeiçoar o alinhamento das sequências) reafirma a existência de 3 grupos conforme a classificação da *Flora Europæa* [Bellarosa *et al.* 2005], mas sem ser contraditória com o esquema geral de Manos *et al.* [2001], que tem a vantagem de incluir um número muito considerável de espécies e assim permitir uma melhor avaliação dos parentescos dentro do género.

Apesar de ser necessária muita precaução na interpretação das filogenias baseadas em caracteres moleculares, elas têm o potencial de virem a dissipar a arbitrariedade inerente aos esquemas clássicos, deste modo podendo avaliar-se melhor qual o grau de afastamento filogenético entre sobreiro e azinheira, o que acarreta *a priori* duas considerações pertinentes para o presente estudo:

- será tanto mais fácil encontrar caracteres moleculares discriminantes entre as duas espécies quanto mais prolongada tiver sido a oportunidade para uma divergência a nível nucleotídico e, consequentemente, a nível proteico; e

- num maior afastamento filogenético, haverá menores probabilidades de ocorrência de híbridos pela acumulação de barreiras genéticas, do que entre espécies mais próximas entre si.

O registo fóssil [Borgardt & Pigg 1999, Kashani & Dodd 2002, Bellarosa 2003] faz associar a diversificação dos *Quercus* à transição climática de Eocénico para o Oligocénico (há cerca de 40 milhões de anos), enquanto formas muito semelhantes às espécies actuais ocorreriam já durante o Miocénico (há 5 a 13×10^6 anos, figura 2.2). Tendo em conta a alternância climática com fases glaciares, e consequentes recuos da flora das regiões temperadas para refúgios localizados a Sul já no Plistocénico (a partir de há $1,5 \times 10^6$ anos), é pouco provável que se possa deduzir a origem geográfica das espécies de *Quercus* que não sejam extremamente recentes.

2) As categorias taxonómicas e o hibridismo

A noção de que espécies diferentes não se cruzam naturalmente — ou antes que a reprodução sexuada se realiza normalmente apenas entre indivíduos da mesma espécie — herdada dos tempos pré-mendelianos [Darwin 1872] e formulada em termos genéticos por Dobzhansky e sobretudo por Mayr para integrar o conceito de espécie na teoria neodarwinista [Van Valen 1976, Dobzhansky *et al.* 1977], encontra no género *Quercus* um dos contra-exemplos mais notáveis [Burger 1975]. O hibridismo entre *Quercus* é de tal maneira conspícuo, que os imperativos

genéticos/reprodutores da definição neodarwinista se tornam incompatíveis com a delimitação de espécies essencialmente morfológica e ecológica, a qual permanece como o critério mais viável para uma taxonomia com sentido prático e consistência filética: nos *Quercus*, a definição neodarwinista tenderia a corresponder aos subgéneros (ou às secções, segundo os esquemas taxonómicos), e não ao que a nomenclatura botânica considera espécies [Burger 1975]. Por vezes preconiza-se considerar espécies que hibridam como sendo subespécies [Kleinschmit & Kleinschmit 2000], mas isso cria mais problemas do que pretende resolver (se é que resolve), nomeadamente por subverter (pelo menos no caso do par em questão, *Q. robur* e *Q. petraea*) alguns dos pressupostos consensuais para a definição de subespécie [Lawrence 1951]. E o termo semi-espécie proposto para o caso particular dos muitos *Quercus* que hibridam [Burger 1975] também parece inadequado, por ser-lhe implícita uma imaturidade do processo de especiação que é contradita pelos factos [Van Valen 1976]. Sem negar a utilidade do conceito neodarwinista baseado em critérios ligados à reprodução, a lição que parece tirar-se das dificuldades da sua aplicação nos *Quercus* é a necessidade de aplicar os conceitos com flexibilidade [Burger 1975].

Uma definição de espécie que procura conferir-lhe a maior flexibilidade e ao mesmo tempo circunscrevê-la em critérios precisos e verificáveis é a de Van Valen [1976], para a qual o critério de delimitação das diferentes espécies é o de cada uma ocupar uma *zona adaptativa* que é única dentro da sua área de distribuição. Este conceito de espécie, dito ecológico (mas também filogenético), não impõe qualquer restrição ao fluxo genético entre espécies simpátricas no seu estado natural, desde que se mantenham como linhagens evolutivas separadas, isto é, ocupando zonas adaptativas diferentes.

Um sistema alternativo de categorização de formas aparentadas, sem referência explícita a espécies mas resultando de estudos de hibridação controlada, são as chamadas categorias Bio-Sistemáticas definidas por Turresson [Lawrence 1951]. Às “espécies” que formam híbridos férteis e viáveis atribui-se a categoria de ecospécies, e ao conjunto entre ecospécies que hibridam a categoria de cenospécie. Uma cenospécie corresponderia *a priori*, aproximadamente, ao nível de secção ou de subsecção. Na nomenclatura de Van Valen prefere-se o termo multi-espécie, pelo facto da cenospécie se definir fora do estado natural [Van Valen 1976].

Não é no sentido da flexibilidade preconizada que vai a noção, mais ou

menos explícita em diversos textos [Toumi & Lumaret 1998, Belahbib *et al.* 2001, Collada *et al.* 2002], que os *Quercus* hibridam frequentemente apenas dentro de secções do mesmo subgénero. Cabe então perguntar qual o esquema taxonómico dentro do qual iria dar-se crédito a tal afirmação. Os híbridos que se formam entre sobreiro e azinheira são um exemplo notável da dificuldade: pelo esquema de Schwarz adoptado pela *Flora Europæa*, trata-se de híbridos entre membros de diferentes subgéneros, e como são em geral viáveis e férteis, esta contradição levou o próprio Schwarz, segundo relata Natividade [1947], a negar a sua existência!

Para exemplificar a complexidade do hibridismo entre os *Quercus*, ilustra-se na figura 2.3 uma compilação dos híbridos espontâneos entre espécies ibéricas, muitos deles férteis, senão todos. Registam-se, por exemplo, só entre 6 espécies do subgénero *Quercus* s.s. (esquema da *Flora Europæa*, excluindo *Q. lusitanica*), 13 combinações duas a duas em 15 possíveis, às quais se vêm acrescentar mais 9 envolvendo outras espécies ibéricas. Como se pode ver nessa figura, os híbridos de sobreiro e azinheira são apenas uma de várias combinações entre espécies de diferentes subgéneros de acordo com o esquema de Schwarz. Conclui-se assim que a referência ao esquema taxonómico da *Flora Europæa*, para além de ser contraditória com esquemas mais actualizados e “objectivos”, dificulta uma correcta apreciação dos fenómenos de hibridismo neste género.

B — Hibridismo e especiação

Sendo as possibilidades de hibridismo entre *Quercus* tão diversificadas, o facto das espécies manterem-se diferenciadas em diversos aspectos (morfológicos, ecológicos, geográficos) leva a postular-se o prevalecimento de selecção disruptiva tendente à eliminação de formas intermédias descendentes de híbridos [Nason *et al.* 1992, González-Rodríguez & Oyama 2005], podendo ou não ser potenciada por uma menor fertilidade desses híbridos [Nason *et al.* 1992, Jiggins & Mallet 2000]. É provável que muitas das espécies que actualmente hibridam já fossem entidades separadas no Pliocénico tardio mas tenham estado sujeitas a sucessivos movimentos de expansão/recolonização e recuo/fragmentação no decurso dos ciclos de glaciação-interglaciação que caracterizaram o Plistocénico, dando a oportunidade repetida para contactos e hibridação [González-Rodríguez *et al.* 2004b]. Neste cenário admite-se, por exemplo, o postulado de sistemas de espécies coevoluindo

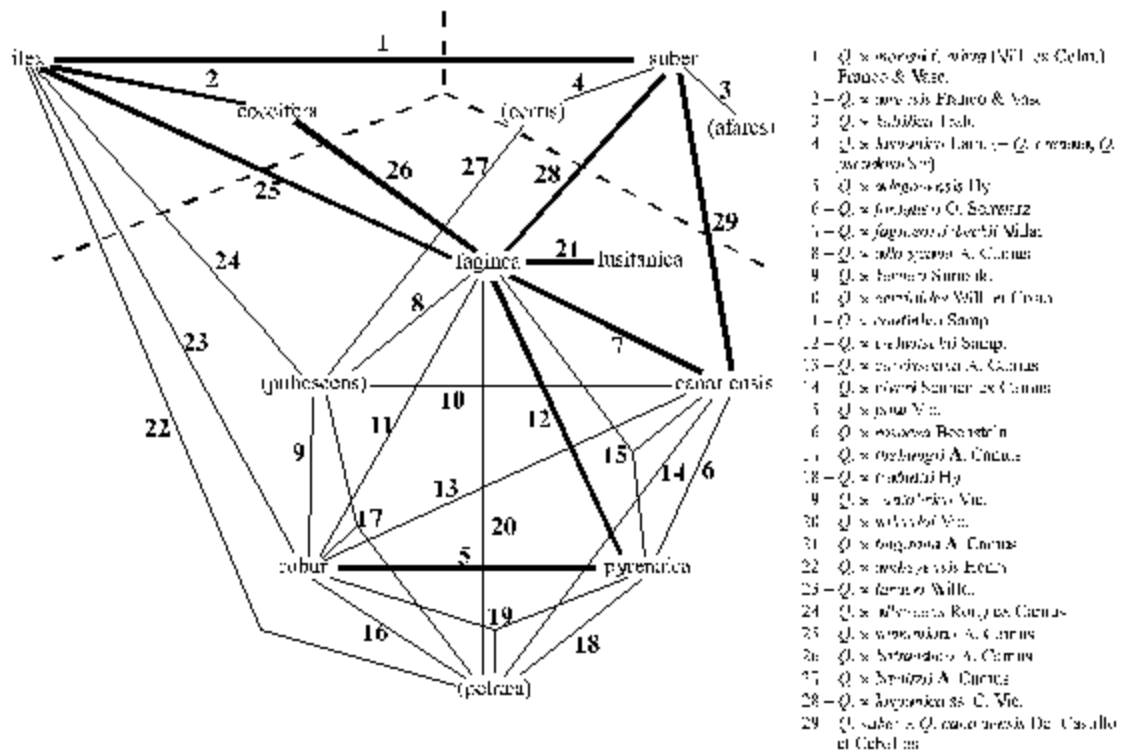


Figura 2.3 — Compilação de híbridos registrados, entre espécies de *Quercus* que ocorrem na Península Ibérica [Coutinho 1888, Natividade 1950, Vasconcelos & Franco 1954, Galliano 1987, Franco 1990, Hédardot s.d.]. Apenas se indicam os restritivos específicos, ficando entre parêntesis os das espécies que não ocorrem em Portugal (além disso, *Q. afarensis* Pomel não é ibérica). A traço mais grosso indicam-se as combinações que podem *a priori* encontrar-se em Portugal. A tracejado, limites subgenéricos segundo o esquema de Schwarz [Tutin 1964]. Todas as designações envolvendo *Q. illex* referem-se em princípio à subespécie *rotundifolia*. 1: híbridos de sobreiro e azinheira; 2: híbridos dentro do subgénero *Sclerophyllodrys*; 3–4: híbridos dentro do subgénero *Cerris*; 5–21: híbridos dentro do subgénero *Quercus*; 22–26: híbridos entre os subgéneros *Sclerophyllodrys* e *Quercus*; 27–29: híbridos entre os subgéneros *Cerris* e *Quercus*.

em habitats partilhados, e onde o fluxo genético entre elas poderia constituir um factor de coesão, nomeadamente pela introgressão de genes relevantes adaptativamente, alargada sobre as várias populações duma mesma multi-espécie [Burger 1975]. Tais sistemas tendem a perpetuar-se nesses habitats e beneficiam da complementaridade ecológica das diferentes espécies, e em ambientes extremos, por exemplo refúgios microclimáticos durante os períodos de glaciação, essa coesão poderia ainda ser mais reforçada. A verificar-se repetidamente a existência de tais sistemas nos *Quercus*, nem mesmo a definição proposta por Van Valen [1976] é suficientemente flexível para as espécies deste género, e pode ser muito difícil definirem-se marcadores genéticos discriminantes entre membros duma mesma multi-espécie. Uma consequência desta situação, é que a diferenciação genética entre os membros destas multi-espécies pode limitar-se a apenas uma componente muito limitada do genoma que

responde à selecção disruptiva, de maneira que nem sempre é de esperar que a diferenciação morfológica seja acompanhada pelos marcadores genéticos dispersos no genoma [González-Rodríguez et al. 2004a].

Por outro lado, em certas condições pode surgir uma nova espécie a partir de uma linhagem híbrida, por um processo de segregação de novos recombinantes entre as espécies parentais chamado “especiação híbrida homoplóide”. Identificaram-se alguns parâmetros fundamentais para o sucesso deste processo, designadamente: fertilidade do híbrido inicial, percentagem de autopolinização no híbrido e sua descendência, vantagem selectiva dos genótipos recombinantes, semelhança cariotípica entre as espécies parentais, e extensão geográfica do contacto entre estas [Rieseberg 1997]. Nos *Quercus* em geral é conhecida a fertilidade de muitos híbridos (ao ponto de constituírem-se grexes de pelo menos 3 espécies, caso dos táxones 15, 17 e 19 da figura 2.3), assim como a aparente uniformidade cariotípica ($2n = 2x = 24$), pelo menos dentro das espécies europeias [Tutin 1964, Franco 1990]; mas no que respeita à taxa de autopolinização nos híbridos, a supor-se que acompanha a tendência do género para preferir a polinização cruzada, ela será baixa, mas isso não é obstáculo desde que o factor selectivo seja suficientemente forte [Rieseberg 1997].

Este modelo de especiação actuarial assim num sentido oposto ao da selecção disruptiva, produzindo zonas híbridas unimodais [Jiggins & Mallet 2000] onde conseguiriam sobreviver os híbridos (e talvez parte das linhagens deles derivadas), especialmente se isoladas em relação às espécies deles progenitoras; pode assim considerar-se a aparente facilidade de hibridação neste género como um factor de favorecimento da especiação por hibridismo, isto é, a formação de novas espécies estabilizadas a partir de híbridos (híbrido-espécies), desde que para a ocupação de novas zonas adaptativas, por exemplo em habitats extremos em relação a pelo menos uma das espécies parentais ou em locais de perturbação ecológica, incluindo antropogénica [Nason *et al.* 1992, Rieseberg 1997, Huxel 1999, Valbuena-Carabaña *et al.* 2005]. Os processos de especiação envolvem a recursividade entre a divergência genética e seus efeitos no isolamento reprodutor e consequente redução do fluxo genético, num fenómeno de *feedback* positivo [Rice & Hostert 1993], e a rápida segregação de novas combinações genotípicas a partir de híbridos férteis serviria de base para o processo. Pode imaginar-se que no género *Quercus*, o mais diversificado das Fagales com as suas mais de 500 espécies [Goværts & Frodin 1998], haja um historial (e potencial para futuro) de especiação a partir de híbridos, e são frequentes as

referências botânicas à possível origem híbrida de algumas espécies. Um exemplo recentemente relatado no género *Pinus* oferece detalhes geográficos, genéticos e ecológicos que ilustram muito bem o modelo de especiação híbrida homoplóide [Wang et al., 2001], e pelo menos um estudo genético invoca o mesmo processo em *Quercus* [Mir et al. 2006] (cf. parte II secção D2).

Parte II: Biologia da reprodução e genética dos *Quercus*

A — Polinização e fertilização

1) Desenvolvimento floral

As flores nos *Quercus* têm duas fases de desenvolvimento: a primeira consiste na diferenciação do primórdio da inflorescência (feminina ou masculina) a partir da Primavera do ano anterior à polinização [Cecich 1997a, Sork et al. 1993a], estacionando durante o Inverno já com os principais órgãos florais diferenciados (carpelos, estames) [Cecich 1997a]; a segunda acompanha o desenvolvimento da nova folhagem nas extremidades dos ramos na Primavera seguinte, e é nesta altura que se dá a meiose nas anteras, antecedendo em 6 semanas a libertação do pólen [Cecich 1997a]. Esta segunda fase pode ainda subdividir-se em estádios macroscopicamente diferenciáveis, a exemplo do que foi definido em sobreiro [Varela & Valdivieso 1996], ordenados da seguinte maneira (figura 2.4): primórdios florais quase indistintos dos foliares (fases A–C), rudimentos de inflorescência em crescimento (fases D–E), maturação (fase F), polinização (fase F2), senescência dos amentos e início do desenvolvimento dos frutos (fases G–H). Para cada uma das fases D–G faz-se a distinção entre floração masculina e feminina acrescentando uma letra, por exemplo Fm2 é a fase de ântese e Ff2 é a fase de receptividade. Sobretudo a partir da fase D, esta subdivisão permite acompanhar facilmente o processo de floração em cada árvore [Brás 1999].

Por serem de observação relativamente fácil, as fases de floração masculina são o objecto de observação utilizado no campo para caracterizar a fenologia do processo em cada indivíduo [Brás 1999, M. C. Varela, não-publicado], mas também se pode optar por acompanhar a fenologia feminina colhendo ramos para serem observados em laboratório

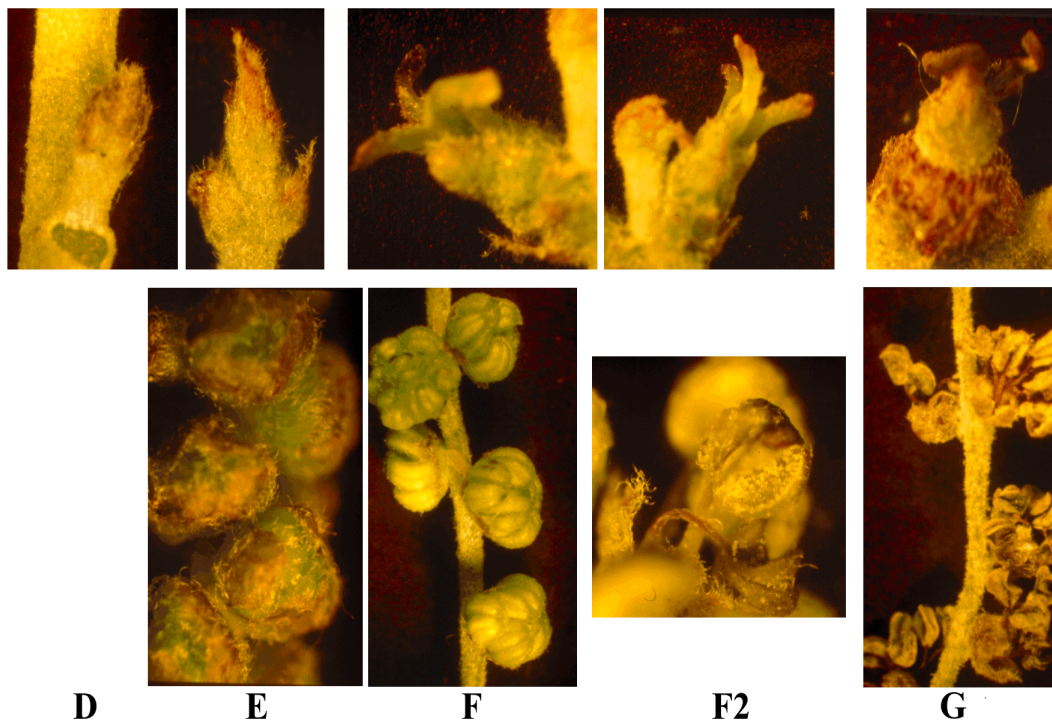


Figura 2.4 — Ilustração dos estádios de desenvolvimento definidos por Varela & Valdivieso [1996] para sobreiro, com a gentil cedência de M. C. Varela. Na fila superior, flores femininas, na inferior, amentilhos (excepto na fase F₂, pormenor das anteras em ântese).

[Díaz-Fernández *et al.* 2004]. A variação fenológica da floração a nível populacional pode assim evidenciar-se como relativamente dispersa no tempo, podendo haver intervalos de mais de 1 mês entre indivíduos da mesma parcela, apresentando uma repetibilidade elevada, isto é, árvores de floração por exemplo precoce num determinado ano são-no provavelmente na maior parte dos anos [M. C. Varela, não-publicado]. Uma consequência desta característica é reduzir-se a possibilidade do cruzamento entre certas árvores distanciadas fenologicamente, mesmo que próximas topograficamente.

Apesar da dispersão fenológica, podem alinhar-se os processos de desenvolvimento floral de diferentes indivíduos usando a ântese como referência [Cecich 1997a], que dura em geral apenas 1 semana ou menos [Williams *et al.* 2001] e antecede em alguns dias o início da receptividade das flores femininas na mesma árvore (protandriso [Vásquez 1998]), receptividade essa — reconhecível pela abertura dos estigmas e seu aspecto lubrificado [Steinhoff 1997] — que pode durar 2 semanas ou mais [Ducousso *et al.* 1993, Williams *et al.* 2001]. No entanto, observou-se a situação inversa (isto é, protoginismo) em *Q. serrata* Thunb. e *Q. mongolica* var. *crispula* (Blume) H. Obashi [Kanazashi *et al.* 1997b], e parece haver exemplos de protoginismo em espécies normalmente protândricas: registaram-se em *Q. suber* florações temporãs, em ramos onde as flores femininas já se encontram fecundadas enquanto as

masculinas ainda só desabrochavam [Natividade 1934 pp. 122–123].

A importância do protandrismo será provavelmente muito relativa, pois dentro da mesma árvore podem encontrar-se ramos em diferentes fases de desenvolvimento, em função não só da exposição ao Sol (os quadrantes mais expostos tendem a ser mais precoces) mas também da altura, com a parte superior da copa mais tardia (de tal modo que podem encontrar-se nos ramos mais altos flores Fm2 enquanto nos mais baixos já se encontram em Ff2) [Vásquez 1998]. Além disso, a proporção de flores dos dois sexos varia entre indivíduos, podendo assim distinguir-se árvores ginomonóicas (essencialmente com floração feminina), andromonóicas (sobretudo masculina) e andróginas [Elena-Rossellò *et al.* 1993, Vásquez 1998]; o facto de verificar-se, em povoamentos de *Q. ilex* ssp. *rotundifolia*, que as árvores ginomonóicas tendem a florir precocemente, e as andromonóicas tardiamente, acaba por resultar num comportamento, à escala populacional, protogínico [Vásquez 1998].

Geralmente passam vários anos desde a germinação até à maturação reprodutora, mas os rebentamentos de toíça ou garfos de árvores maduras florescem e frutificam prontamente [Cecich 1997a].

A temperatura afecta sobretudo a floração masculina, atrasando o respectivo desenvolvimento se for mais baixa que o normal, e antecipando a ântese se for elevada [Cecich 1997a] — a ponto de ocorrer ainda no Outono ou princípios de Inverno em anos mais quentes, como se observa nalgumas azinheiras [Brandão 1996]; a produtividade feminina não é afectada a não ser que se dêem extremos térmicos que destruam as flores [Cecich 1997a].

2) Polinização

A polinização anemófila, isto é, o transporte do pólen pelo vento, é claramente predominante nos *Quercus* [Manos *et al.* 2001], sendo o contributo dos insectos (abelhas, afídeos, formigas e dípteros) residual [Vásquez 1998]. Sobre a viabilidade do pólen dos *Quercus* em condições naturais só existe informação em algumas espécies, nem sempre comparável: em *Q. petraea* e *Q. pubescens* prolonga-se por 25 dias à temperatura ambiente [Bruschi *et al.* 2000], para *Q. gambelii* Nutt. e *Q. grisea* Liebm. contaram-se mais de 2 semanas sobre gelo, num exsiccador [Williams *et al.* 2001], e mantinha-se ao fim de 4 semanas em 40% de pólen de *Q. ilex* ssp. *rotundifolia*, 48% do de *Q. coccifera*, 50% do de *Q. faginea*, e 57% do de *Q. suber* [Gómez-Casero *et al.* 2004]. Mas o pólen de árvores sobrevivendo em condições ambientais limite, mesmo sendo viável em testes de laboratório, pode não ser inteiramente funcional, o que

pode ter implicações importantes para o hibridismo (hipótese da emasculação ambiental, cf. secção C3 [Williams *et al.* 2001]). No mesmo sentido vai a observação dum marcado contraste entre as estimativas de viabilidade às 48 horas e a correspondente taxa de germinação, que chega a baixar para $\frac{1}{4}$ daquele valor em *Q. suber* [Gómez-Casero *et al.* 2004].

A polinização é afectada por factores ambientais, na medida em que a chuva e mesmo a humidade relativa reduzem a dispersão do pólen [Cecich 1997a]. Em contrapartida, condições de secura (menos de 75% de humidade relativa) reduzem a viabilidade e germinabilidade do pólen e o tempo de receptividade dos estigmas [Vásquez 1998].

Os *Quercus* são tidos como exemplos de árvores que evitam a autopolinização [Hamrick *et al.* 1979, Sedgley & Griffin 1989]. O principal contributo do protandrismo pode ser o de reduzir a possibilidade de autofertilização dentro do mesmo ramo, mas tendo em conta o desfasamento entre as florações masculinas de ramo para ramo na mesma árvore, e a duração da viabilidade do pólen, existe oportunidade para autopolinização, especialmente em indivíduos que produzem muito pólen.

Deverão existir factores compensatórios da autopolinização, dos quais se destaca a autoincompatibilidade, como se verifica em polinizações controladas (cf. secção C) e pela caracterização de descendências espontâneas com marcadores genéticos altamente polimórficos (cf. secção D1). Essa autoincompatibilidade deverá resultar dum controlo gametofítico (isto é, sobre os genótipos dos gametófitos masculinos) do crescimento do tubo polínico [Ducousso *et al.* 1993]. Contudo, Cecich [1997b] fez uma interpretação diferente dos padrões de abortamento dos tubos polínicos em *Quercus alba*, *Q. rubra* e *Q. velutina* Lam., postulando factores ambientais ou um controlo esporofítico.

Na nuvem polínica a que estão expostas as flores receptivas duma determinada árvore poderão estar largamente representadas árvores vizinhas e fenologicamente síncronas, se as houver, sendo o restante de origem mais remota. Os progenitores masculinos em localizações remotas individualmente menos representados na polinização duma árvore em Ff2, mas em muito maior número do que os vizinhos também representados, contribuem em princípio com uma grande variabilidade genética. Assim, pode predizer-se que os *Quercus* tendem a ser dualmente polinizados: por alguns indivíduos próximos topograficamente, que tenderão a ser os mesmos ano após ano em função da sua maior ou menor persistência em coincidirem fenologicamente com a árvore que polinizam, e por uma massa extremamente diversificada de indivíduos de origens mais ou menos remotas. A primeira componente pode imprimir uma diferenciação

significativa entre as populações de gâmetas masculinos participantes na formação de cada família. E, dada a longevidade destas espécies (em geral férteis durante várias dezenas de anos) e a sua prolificidade (não é invulgar a contagem de 1000 sementes descendentes duma só árvore por ano, e num ano de safra até muito mais), cada árvore terá o potencial de deixar uma descendência muito numerosa e muito diversificada geneticamente, mas diferenciada da de outras árvores da mesma população.

Hibridismo

A separação fenológica é *a priori* uma boa barreira de separação entre espécies, mas dada a grande variabilidade temporal entre indivíduos nas suas fases de ântese/ receptividade, acaba sempre por poder haver uma sobreposição entre as épocas de reprodução de 2 espécies simpátricas, e portanto uma fase em que as nuvens polínicas locais serão mistas. Assim, o isolamento entre espécies deve também residir em mecanismos actuando após a polinização, seja durante a germinação dos tubos polínicos ou no seu desenvolvimento através do estilete, na competição entre eles para os óvulos, e ainda na viabilidade dos embriões ou no vigor vegetativo das plantas germinadas [Bruschi *et al.* 2000]. Em grande parte desconhece-se a contribuição relativa destes factores, mas há resultados de experiências de polinização controlada bastante informativos (revistos na secção C).

É comum assumir-se que uma espécie cuja época de floração é a mais tardia deverá ser a polinizadora nos eventos de hibridismo, porque o protandriso favorece nesse sentido [Boavida *et al.* 2001] (ou a de floração mais precoce, nos casos de protoginismo [Kanazashi *et al.* 1997b]). Porém, se se levar em conta a contribuição de proveniências mais remotas para a polinização, e supondo que a viabilidade desse pólen é suficientemente longa, a questão do sentido preferencial do fluxo genético por hibridismo não dependerá do protandriso — mas então torna-se importante incluir o factor viabilidade nos estudos a serem feitos.

3) Fertilização

Os tubos polínicos desenvolvem-se logo que os grãos de pólen atingem o estigma receptivo, que se caracteriza pela sua adesividade, atravessando o estilete até à sua base, onde param de crescer entre poucas semanas até cerca de 1 ano, segundo a espécie tem frutificação anual ou bienal, respectivamente [Cecich 1997a, Boavida *et al.* 1999]. Ao retomarem o crescimento, que é coordenado com a megasporogénese [Cecich 1997a],

atingem o ovário com 6 óvulos, dos quais apenas 1 (presumivelmente o primeiro a ser fertilizado) se desenvolverá até formar a semente [Mogensen 1975, Ducousso *et al.* 1993, Williams *et al.* 2001].

Pode haver espécies em que a frutificação é facultativamente anual ou bienal, o que implicaria a possibilidade de no mesmo ano de frutificação coexistirem sementes resultantes de dois anos sucessivos de polinização. Esse pode ser o caso do sobreiro, cujo “bastão” (lande relativamente precoce) se presume ser bienal e ocorre especialmente em regiões mais frias, onde o ciclo vegetativo é mais curto, e em indivíduos com floração tardia para a espécie (ou em segundo surto de floração), ambos os factores levando a diferir a fertilização para a Primavera seguinte [Elena-Rossellò *et al.* 1993, Vásquez 1998, Bellarosa 2003, Díaz-Fernández *et al.* 2005]. A ocorrência excepcional de floração feminina no Outono poderá dar lugar a frutos mais precoces, mas normalmente é improdutiva [Vásquez 1998, Díaz-Fernández *et al.* 2005].

B — Frutificação, dispersão e germinação

1) Flutuações da produção de semente

A produção de semente nos *Quercus* oscila de ano para ano, ocorrendo frutificações particularmente abundantes, a que se dá o nome de safras, em anos relativamente afastados entre si. Além das influências exógenas (precipitação, temperaturas, insectos consumidores das sementes), atribui-se grande relevância aos ritmos endógenos relacionados com a disponibilidade de reservas metabólicas para investir na reprodução, sendo a produção de flores femininas condição necessária mas não suficiente para ocorrer uma safra (o abortamento de flores polinizadas é considerado um processo complementar de regulação endógena [Vásquez 1998]).

Numa comparação entre *Q. alba* (frutificação anual), *Q. rubra* e *Q. velutina* (ambas bienais), durante um período de 8 anos, verificou-se que a intensidade de produção era periódica, e que a duração do período era característica para cada uma dessas espécies [Sork *et al.* 1993a]: em *Q. alba* durava 3 anos, no qual a um ano de maior produção se seguiam dois de pouca semente, o primeiro de relativo “repouso” mesmo a nível de floração, e o segundo de iniciação dum maior número de primórdios florais donde resultariam no ano seguinte os frutos de novo pico de produção; em *Q. rubra* o padrão seria semelhante, mas com um ciclo de 4 anos por causa da frutificação bienal; quanto a *Q. velutina*, o ciclo de produção aparente era de 2 anos, diferindo de *Q. rubra* pelo facto de,

num ano de grande produção, estarem já a iniciar-se os primórdios florais do pico de produção seguinte.

Num estudo com sobreiros em Portugal [M. C. Varela, não publicado], a intensidade de floração, que se verificou ser bastante diferenciada entre indivíduos, não se correlacionava com a respectiva intensidade de frutificação, de tal modo que a produtividade individual de cada árvore era imprevisível na maior parte dos casos. Porém, em termos médios para o conjunto da parcela as duas características flutuavam quase paralelamente de ano para ano, com uma alternância entre anos de alta e baixa produção de semente com período de 2 anos, embora fosse patente alguma perturbação desta periodicidade por condições de secura fora do normal.

2) Dispersão e selecção pós-germinação

Entre a germinação duma semente de *Quercus* e atingir-se a fase adulta têm de conjugar-se condições edáficas e climáticas propícias, suficiente exposição à luz solar e sobrevivência aos herbívoros (factores extrínsecos), e capacidade de competir para esses recursos com outras plantas, sejam da mesma espécie ou doutras (factores intrínsecos). Daí que, nas descendências produzidas, se tenha de contar com elevadas taxas de eliminação.

O valor nutritivo das sementes dá-lhes uma grande importância ecológica para diversos animais, que com a sua actividade (principalmente aves e mamíferos) chegam a fazê-las desaparecer do local de queda apenas no espaço de 1 dia [Siscart *et al.* 1999]. Essa actividade contribui grandemente, pela dispersão que opera nas sementes, para uma relativa homogenização dos genótipos nas populações. Mas é na imprevisibilidade da ocorrência duma safra que há uma melhor oportunidade para a regeneração natural, por criarem-se excedentes de semente em relação à acção dos herbívoros, interpretação que é reforçada pela evidência de sincronização intra-específica, quer em espécies bienais quer nas anuais [Liebold *et al.* 2004].

Após a germinação coloca-se o problema do ensombramento para as plantas em desenvolvimento, limitando-o mais ou menos dependendo da densidade dos povoamentos e da tolerância da espécie: assim, a regeneração efectiva dentro de uma população natural densa, dominada por árvores adultas, só se dá esporadicamente, em pontos deixados livres pelo desaparecimento dum adulto [Dow & Ashley 1997, Cottrell *et al.* 2003]; no entanto, a adaptação de certos *Quercus* ao ensombramento é um factor de competição com espécies pioneiras [Petit *et al.* 2003]. Uma

folhagem espinhosa na fase jovem, como é o caso da azinheira, pode contribuir para reduzir o impacto dos herbívoros.

Os factores intrínsecos relacionam-se com o valor genotípico de cada indivíduo para atingir o porte adulto, nas condições do local onde germina, o que contribui substancialmente para a sua adaptabilidade diferencial (*fitness*) [Falconer & MacKay 1996]. As diferenças de adaptabilidade expressam-se a vários níveis: entre indivíduos da mesma população [Müller-Starck *et al.* 1993], com a observação de variações fenotípicas importantes dentro de pequenas áreas, isto é, em condições edafoclimáticas relativamente homogéneas, ou nas descendências de cada indivíduo, havendo ainda que contar com a eventualidade do hibridismo ter valor adaptativo (cf. parte I secção B). Mais do que pelas variações morfológicas que, podendo assentar na plasticidade fenotípica frequente nos *Quercus*, não terá grande significado para o *fitness*, é sobretudo em aspectos fisiológicos que se devem procurar padrões de adaptabilidade [Kriebel 1993, Sork *et al.* 1993b]. Mesmo na criação em viveiro, em princípio sob condições uniformes e controladas [Varela *et al.* 2003a], se manifestam diferenças de vigor entre indivíduos que são sugestivas de diferenças que se expressam no desenvolvimento das plantas após a germinação, sendo de presumir que tais diferenças de vigor em fases precoces tenham relevância para a adaptação local em condições naturais (por outras palavras, na manutenção do *fitness* a nível populacional).

C — Experiências de polinização controlada

Conhecem-se alguns estudos experimentais de polinização controlada nos *Quercus* que têm permitido comparar o sucesso de diferentes modelos de cruzamento e nalguns casos caracterizar os processos que decorrem desde a germinação do tubo polínico até ao desenvolvimento do fruto. Evidentemente, esta abordagem tem as suas limitações por envolver manipulações experimentais que em maior ou menor grau se afastam da polinização natural, mas tem a seu favor o aprofundamento que permite e a corroboração parcial pelas observações com marcadores genéticos (cf. secção D).

1) O processo de desenvolvimento desde a polinização até à maturação do embrião

Em primeiro lugar, há que sublinhar o facto de todo o processo se caracterizar por taxas de abortamento muito altas, desde logo nas flores femininas polinizadas e continuando nos frutos em desenvolvimento, taxas essas que se pode considerar não serem uma consequência trivial das

manipulações (emasculação, isolamento dos ramos, colheitas). Assim, na natureza as potencialmente abundantes produções de semente de cada ciclo reprodutor representam apenas uma ínfima parte dos tubos polínicos germinados [Yacine & Bouras 1997, Cecich 1997b, Kanazashi & Kanazashi 1997, Boavida *et al.* 2001], o que é de especial relevância para qualquer discussão que se possa fazer, por exemplo no contexto da hibridação, sobre a relação entre a origem do pólen que atinge as flores receptivas de uma árvore e as características da descendência dessa árvore. Contudo, e como se verá, nalguns casos demonstrou-se que as taxas de abortamento podem variar conforme a origem dos gametófitos masculinos.

Na figura 2.5 representa-se esquematicamente a sequência de todo o processo. Nele se assinalam duas pausas: durante a passagem do inverno antes da polinização (A), e durante a espera dos tubos polínicos para que se complete o desenvolvimento do gametófito feminino (B) — ambas parecem não estar associadas a qualquer forma de abortamento das flores ou dos frutos. Os processos que levam a grande parte do abortamento floral correspondem antes a fases activas de crescimento, uma delas pré-zigótica (S1) que acompanha o desenvolvimento dos tubos polínicos, especialmente nas primeiras fases, e outra pós-zigótica (S2) associada à diferenciação do embrião.

2) Polinização *self*, conspecífica ou heterospecífica

As experiências de polinização controlada incluem em geral a comparação entre diferentes tipos de polinização. Assim, para além da polinização *self* (pólen da própria árvore) consideram-se a polinização conspecífica (pólen de indivíduos da mesma espécie, representados individualmente ou em misturas de pólenes) e heterospecífica (com pólen de indivíduos de outra espécie). Note-se que a polinização livre (natural) é em teoria uma mistura dos três tipos, mas surpreendentemente isso não parece ser determinante para o desenho experimental destes estudos.

Do ponto de vista da produção de frutos, a eficiência dos diferentes tipos de polinização controlada tende a ser maior com a polinização conspecífica do que com a heterospecífica, e mínima com polinização *self* (*Q. petraea* e *Q. robur* [Steinhoff 1997], *Q. gambelii* e *Q. grisea* [Williams *et al.* 2001], *Q. suber* e *Q. ilex* ssp. *rotundifolia* [Boavida *et al.* 2001]).

Estas comparações só são válidas do ponto de vista da espécie que é polinizada, pois para as mesmas condições experimentais verificam-se grandes diferenças entre espécies. Aliás, o sucesso relativo das polinizações conspecífica e heterospecífica pode ser afectado por

condições ambientais “emasculadoras” [Williams *et al.* 2001], ou não ser mensurável em espécies refractárias à polinização controlada (caso de *Q. suber* [Boavida *et al.* 2001]). Além disso, as incompatibilidades entre indivíduos da mesma espécie (*Q. ilex* ssp. *rotundifolia* [Yacine & Bouras 1997]) ou de espécies próximas (*Q. petraea* e *Q. robur* [Kleinschmit 1993], *Q. serrata* com pólen de *Q. mongolica* var. *crispula* [Kanazashi *et al.* 1997b]) podem resultar em improdutividades comparáveis às das polinizações *self*, ou até piores.

3) Processos de eliminação

Fases S1 e S2

Em todos os tipos de polinização controlada é usual observar o abortamento de flores femininas nos primeiros dias após a aplicação do pólen, identificada com a fase S1 da figura 2.5 [Kanazashi & Kanazashi 1997, Yacine & Bouras 1997, Boavida *et al.* 2001], e distinta do abortamento observado em flores não-polinizadas e autopolinizadas (caso de *Q. serrata* [Kanazashi & Kanazashi 1997]), que ocorre mais tarde enquanto noutras flores se desenvolve o endosperma. A maior proporção de abortamento das flores ocorre na fase S1 [Kanazashi & Kanazashi 1997, Yacine & Bouras 1997, Boavida *et al.* 2001], podendo ser desencadeada quer pela interacção entre pólen e estigma [Yacine & Bouras 1997], quer pelo bloqueamento dos tubos polínicos no estigma e estilete, presumivelmente por interacções com a flor feminina e/ou factores ambientais [Cecich 1997b, Boavida *et al.* 1999]. Pelo menos num

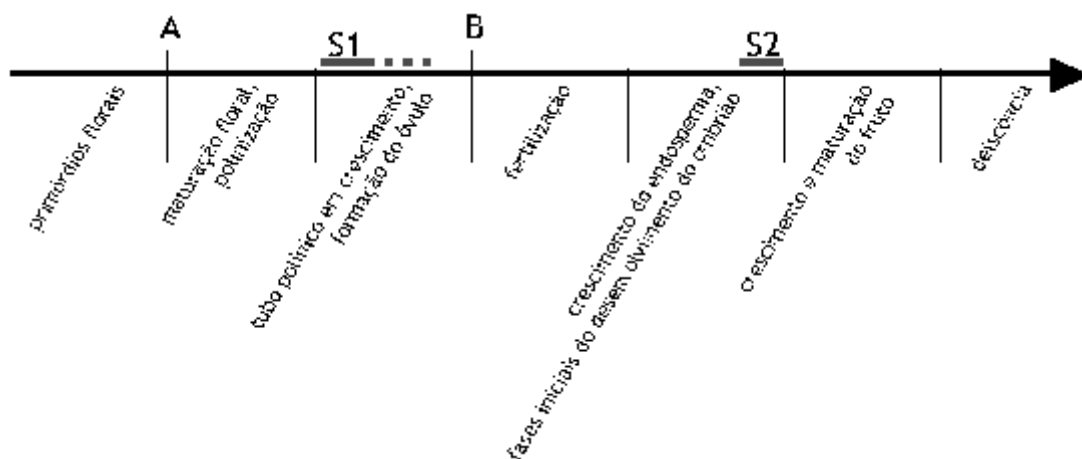


Figura 2.5 — As fases da reprodução sexuada dos *Quercus*, evidenciando duas pausas (A, primórdios florais imaturos no inverno anterior à polinização; B, tubos polínicos na base do estilete, enquanto não se conclui a megasporogénese, que nas espécies de frutificação bienal abrange um segundo inverno) e dois períodos de maior incidência de abortamento floral (S1) e dos frutos (S2). A extensão das fases não é ilustrada em proporção à escala de tempo. Compilado de várias fontes [Cecich 1997a,b, Williams *et al.* 2001, Kanazashi & Kanazashi 1997, Yacine & Bouras 1997, Boavida *et al.* 1999, Sork *et al.* 1999].

caso não houve diferenças entre a polinização conspecífica e a heterospecífica, em termos de eliminação pré-fertilização [Williams *et al.* 2001].

O abortamento de frutos na fase S2 pode variar com o tipo de polinização, sendo relativamente mais elevado na heterospecífica em comparação com a conspecífica [Kanazashi *et al.* 1997b, Boavida *et al.* 2001, Williams *et al.* 2001]. No caso das polinizações *self*, julga-se que a expressão de recessivos letais compromete o desenvolvimento dos frutos, seja em termos de abortamento ou de peso final [Steinhoff 1997, Williams *et al.* 2001], julgando-se ser essa a razão para a fraca taxa de germinação das sementes resultantes [Steinhoff 1997, Yacine & Bouras 1997].

Kanazashi *et al.* [1997b], ao aplicarem em flores de *Q. serrata* uma mistura de pólen conspecífico e heterospecífico, de parceiros previamente verificados como compatíveis, obtiveram uma proporção muito baixa de sementes híbridas (identificadas através de isoenzimas discriminantes), sugestiva duma maior eficiência da linhagem homospecífica — contudo, não foi determinado se o contraste se deu ao nível da germinação no estigma, do desenvolvimento do tubo polínico, da fertilização ou da diferenciação do embrião.

Pólen incompatível

O pólen *self* é o paradigma da incompatibilidade entre dois parceiros. No estudo com azinheira [Yacine & Bouras 1997] foi demonstrado, em polinizações envolvendo pólen *self* (misturado com o pólen doutro indivíduo ou em polinização livre) que ele tem um papel indirecto no abortamento floral, ao que parece através da sua lenta germinação no estigma; o número presumivelmente elevado de gametófitos *self* presentes em polinização livre terá sido a provável causa para o aparente “cancelamento” do processo, sugerido pela correlação positiva entre o abortamento floral e o número de tubos polínicos atravessando o estigma e o segmento superior do estilete. Nesse mesmo estudo, a incompatibilidade entre indivíduos parecia expressar-se através da correlação entre o número de tubos polínicos a atingirem o ovário (antes do ponto B na figura 2.5) e o abortamento dos frutos, sugestivo de que um excesso de tubos polínicos nessa região do pistilo resulta também num “cancelamento”.

De notar que as variações individuais na compatibilidade com outros parceiros se expressam também na proporção de flores e frutos abortados em cada árvore [Kanazashi & Kanazashi 1997, Yacine & Bouras 1997].

A outro nível, a incompatibilidade entre parceiros manifesta-se por uma frequente “assimetria” do fluxo genético entre espécies. As polinizações heterospecíficas são geralmente melhor sucedidas num sentido que no outro, isto é, quando o parceiro feminino é duma das espécies — *Q. robur* com pólen de *Q. petraea* [Kleinschmit 1993, Steinhoff 1997], *Q. serrata* com pólen de *Q. mongolica* var. *crispula* [Kanazashi *et al.* 1997b], *Q. gambelii* com pólen de *Q. grisea* [Williams *et al.* 2001], *Q. ilex* com pólen de *Q. suber* [Boavida *et al.* 2001]. Embora falte o teste crítico com misturas de pólen, poderia deduzir-se uma direcionalidade preferencial do hibridismo em cada par de espécies. Uma predição desta direcionalidade preferencial é o predomínio nos híbridos de DNA citoplásmico da espécie mais receptiva [Williams *et al.* 2001] (os exemplos conhecidos são revistos na secção D2 e também na parte III, secção D2); como discutido na secção A2, a diferenciação temporal entre espécies, em termos de época de floração, deverá ter um papel muito secundário na determinação dessa direcionalidade.

Emasculação ambiental

Num estudo com duas espécies da secção *Albæ*, *Q. gambelii* e *Q. grisea* [Williams *et al.* 2001], em dois locais diferindo na taxa espontânea de hibridismo, sugeriu-se que as diferenças ecológicas entre os dois locais tinham como consequência previsível o relaxamento das barreiras interspecíficas; neste caso, o local com hibridismo era aquele onde *Q. gambelii* se encontrava no seu limite ecológico, e em particular era o desempenho do seu pólen que se ressentia dessas condições-limite (em cruzamentos conspecíficos, independentemente do número de grãos de pólen aplicados), produzindo menos frutos do que no local onde não havia hibridismo. Nas ditas condições-limite, os indivíduos de *Q. gambelii*, que por acréscimo tinham pouca floração masculina embora continuassem normalmente produtivos em termos de floração feminina, encontravam-se como que isolados entre si para a reprodução sexuada, deste modo facilitando-se a produção de descendências híbridas por “submersão” com o pólen doutras espécies compatíveis, neste caso *Q. grisea*. Esta hipótese de “emasculação ambiental” [Williams *et al.* 2001] parece explicar correctamente as observações do estudo a que se refere, e pode provar-se um poderoso auxiliar na previsão de hibridismo noutros pares de espécies, embora por enquanto não seja consensual [Petit *et al.* 2003], apesar do rigor posto no seu desenho experimental.

É aliás notável a analogia desta hipótese com outra, de acentuado hibridismo nos refúgios durante a última glaciação, resultando cada

árvore encontrar-se também quase isolada em relação a outras da mesma espécie e em condições ambientais extremas [Kashani & Dodd 2002] (cf secção D2, “DNA citoplásmico”).

4) Síntese

Em resumo, as observações em diversas espécies de *Quercus* não parecem contradizer-se entre si, antes permitindo traçar um conjunto de caracteres gerais relevantes para o conhecimento da biologia da reprodução neste grupo:

- As plântulas que emergem das sementes derivam duma amostra ínfima do pólen que atinge as árvores progenitoras, em resultado da selecção a que estão sujeitos tubos polínicos e embriões em desenvolvimento (fases S1 e S2 da figura 2.5), a que se acrescenta a sua destruição pelos insectos;

- A intensidade da selecção até à maturação das sementes varia segundo factores de compatibilidade com a planta materna e/ou competição entre tubos polínicos, sendo a rejeição de pólen *self* um exemplo constante de forte selecção negativa, a que se acrescenta a tendência das sementes produzidas deste pólen terem menor taxa de germinação;

- Existe uma grande variação intra-específica, expressa em diversos graus de incompatibilidade entre indivíduos, nos padrões de eliminação que decorrem entre a polinização e a fertilização;

- Excepto em condições-limite (cf. hipótese da “emasculação ambiental”), o sucesso relativo do pólen heterospecífico é bastante inferior ao do pólen conspecífico, embora tenda a ser superior ao do pólen *self* pelo menos entre espécies que usualmente hibridam entre si.

Em conclusão, o hibridismo entre *Quercus* na natureza tende a ser improvável, mas a produção de sementes durante a prolongada vida reprodutora dum *Quercus* é suficientemente abundante para a emergência de combinações improváveis, por isso conferindo-lhe algum significado, que se pode acentuar devido a factores adicionais, por exemplo ambientais, que as favoreçam.

D — Parâmetros genéticos

A contribuição de várias classes de marcadores genéticos, com recurso a tratamentos estatísticos diversos, tem sido particularmente relevante para o esclarecimento dos processos reprodutores intra-específicos em *Quercus*, mas no que respeita aos envolvidos na hibridação já não se pode

dizer o mesmo. Por isso serão analisados separadamente.

1) Fluxos genéticos intra-específicos

Duas estratégias para a caracterização dos fluxos polínicos

Têm-se utilizado essencialmente duas estratégias para análise dos processos reprodutores com marcadores genéticos [Smouse & Sork 2004]. Apesar de haver necessidade de aperfeiçoar a base teórica de qualquer destas estratégias [Burczyk & Chybicki 2004, Walter & Epperson 2004, Austerlitz *et al.* 2004, Dutech *et al.* 2005], é inegável que a compreensão da biologia da reprodução dos *Quercus* já tem beneficiado de progressos significativos com os marcadores genéticos.

A primeira coloca a ênfase na identificação dos polinizadores, e envolve a caracterização genotípica de tantos indivíduos quanto possível de modo a permitir construir curvas de distribuição das origens do pólen em função da sua distância às árvores polinizadas, e a calcular taxas de *selfing*, de imigração e (cf. secção 2) de hibridação.

A segunda estratégia coloca a ênfase na especificidade da população polínica utilizada por cada árvore e requer apenas a caracterização genotípica das descendências e respectivas mães, o que, usando marcadores suficientemente informativos, permite determinar com precisão o genótipo de cada grão de pólen; menos exigente que a primeira na dimensão de amostragem da família, tem de abranger um grande número de famílias para ser efectiva [Smouse *et al.* 2001, Austerlitz & Smouse 2001]. Dela se pode calcular a estatística Φ_{FT} [Smouse *et al.* 2001], definida como a probabilidade de dois grãos de pólen representados numa família virem do mesmo indivíduo, sendo dependente de vários parâmetros, entre os quais a dispersão média do pólen a partir de cada árvore (δ) e a forma da distribuição do pólen no espaço bidimensional [Austerlitz & Smouse 2002]; o inverso de Φ_{FT} é proporcional ao número efectivo de polinizadores por família, N_{ep} , parâmetro que, levando em conta a densidade dos potenciais polinizadores por unidade de área, permite determinar δ [Smouse & Sork 2004]. Contudo, subsistem diversas incógnitas sobre o valor *efectivo* dessa densidade, devido às irregularidades existentes (nem todos os adultos se reproduzem em todos os anos, nem com igual intensidade, nem simultaneamente [Austerlitz & Smouse 2001, Smouse & Sork 2004]), por isso, se por um lado δ é um padrão de comparação importante [Smouse & Sork 2004], a assimetria da distribuição de polinizadores em

função da distância e sobretudo o desconhecimento sobre o respectivo modelo matemático [Austerlitz *et al.* 2004] torna problemática a sua estimação para cada caso.

O desenho de amostragem apropriado para a segunda estratégia é-o também para os cálculos de percentagens de *selfing* e de consanguinidade biparental (resultante da correlação genética positiva entre parceiros de cruzamento) [Ritland 1990].

Os polinizadores

Os micro-satélites nucleares (*loci* nSSR) têm sido os principais protagonistas desta abordagem: altamente polimórficos e a maior parte não ligados cromossomicamente, nem precisam de ser muitos para a identificação de cada adulto dum povoamento, sem ambiguidades. Segundo os estudos, demonstrou-se maior ou menor tendência dos polinizadores mais próximos serem os individualmente mais representados na amostragem (figura 2.6), donde se conclui que o número efectivo de progenitores polínicos por família pode ser bastante limitado [Dow & Ashley 1997, Streiff *et al.* 1999]. Apesar disso, geralmente a maior parte das descendências derivam de pólen de origem remota (de polinizadores diferentes dos identificados nas parcelas de estudo): já corrigido o “fluxo polínico críptico”, que leva em conta a possibilidade de haver pólen externo idêntico ao do produzido por estes progenitores, calculou-se 62% de pólen remoto numa parcela de *Q. macrocarpa* [Dow & Ashley 1997], 65% num povoamento misto de *Q. robur* e *Q. petraea* [Streiff *et al.* 1999], 69% e 64% noutra de *Q. pyrenaica* e *Q. petraea*², o que pode surpreender na população de *Q. petraea*, por estar bastante afastada de povoamentos da mesma espécie [Valbuena-Carabaña *et al.* 2005], e só em fragmentos populacionais de *Q. humboldtii* Bonpl. relativamente isolados é que se cifrou pelos 32% [Fernández-M. & Sork 2005].

Seria necessário realizar amostragens cobrindo áreas muito grandes para determinar com algum rigor a forma da curva de distribuição dos potenciais polinizadores em função do espaço, o que se pode tornar impraticável por várias razões. Esta questão tem implicações sobretudo na estimação correcta de parâmetros como a densidade dos polinizadores mais próximos e a distância média de polinização [Dutech *et al.* 2005],

² Os autores deste estudo preferiram apresentar a taxa de imigração, no sentido clássico do parâmetro populacional *m*, como sendo a percentagem de gametas masculinos ou femininos sem correspondência com os adultos genotipados, após correcção do fluxo genético críptico: 38% para *Q. pyrenaica* e 34% para *Q. petraea*.

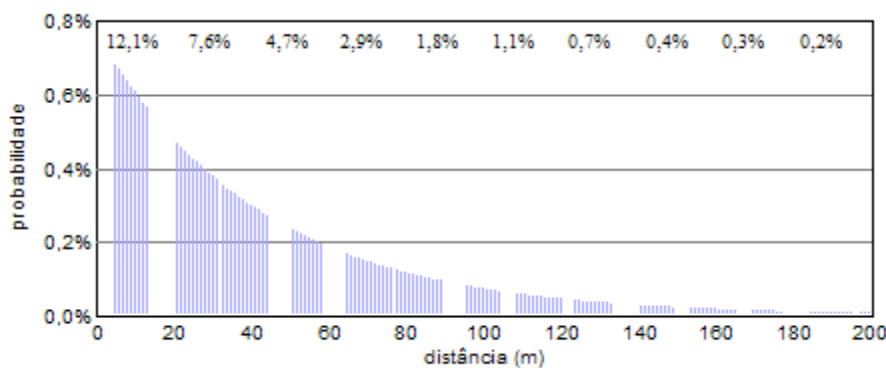


Figura 2.6 — Distribuição teórica dos polinizadores de árvores de *Q. petraea* em termos de distância num espaço bidimensional (intervalos de 1 metro), segundo um modelo exponencial de expoente negativo (distribuição leptocúrtica em comparação com a gaussiana). As percentagens são para as sucessivas coroas de 20 metros, e o conjunto soma 31,8% até aos 200 metros. A curva para *Q. robur* foi quase idêntica (adaptado de Streiff *et al.* [1999]).

e verificou-se por modelação que a função exponencial da figura 2.6 [Streiff *et al.* 1999] não será a melhor para as observações de várias espécies, incluindo *Q. lobata* Née [Austerlitz *et al.* 2004].

Apenas um estudo quantificou, num total de 959 descendentes de *Q. robur* e *Q. petraea*, 15 de pólen *self*, isto é, cerca de 1,6% [Streiff *et al.* 1999].

As famílias

Ainda antes de ter-se desenvolvido a estatística Φ_{FT} , já se tinha revelado com *loci* nSSR a heterogeneidade genética entre as diferentes famílias produzidas numa parcela de cerca de 5 hectares com igual representação de *Q. robur* e *Q. petraea* [Streiff *et al.* 1999], reflectindo a heterogeneidade entre o pólen que fertilizou as diferentes árvores, isto apesar de globalmente a nuvem polínica presumir-se homogénea para toda a população, o que após repetidas demonstrações daquela heterogeneidade foi apelidado de “mito estatístico” [Smouse *et al.* 2001, Smouse & Sork 2004].

Tendo em conta resultados como o da figura 2.6, a provável causa da diferenciação do património genético (polínico) disponível para cada árvore reflecte a importância dos polinizadores mais próximos. De facto, a teoria baseada no cálculo de Φ_{FT} sugere que o pólen recebido por cada árvore deriva dum número limitado de “progenitores efectivos” [Smouse & Sork 2004], o que é inesperado para espécies de polinização anemófila mas que se entende perfeitamente em termos de valores efectivos; e que a distância média de dispersão polínica é, salvaguardando as ressalvas enunciadas acima ao cálculo de δ , de apenas umas dezenas de metros.

Numa abordagem muito diferente, mas essencialmente convergente, a análise de *loci* nSSR ligados no mesmo cromossoma permitiu, a partir do número de haplótipos de pólen que fecundou cada árvore mãe, determinar correlações genéticas significativas entre gâmetas masculinos que fecundaram cada árvore em *Q. robur* [Lexer *et al.* 2000], levando à estimativa de algumas dezenas de progenitores reais.

Em *Q. humboldtii*, usando esta estratégia de amostragem, determinou-se que a taxa de *selfing* atinge 3% [Fernández-M. & Sork 2005], podendo ir até 6% noutras espécies [Smouse & Sork 2004].

No contexto do controlo de contaminantes nos lotes comerciais de semente de *Q. robur*, e tirando partido do elevado polimorfismo dos *loci* nSSR e de variados tratamentos estatísticos, demonstrou-se que o conhecimento *a priori* do genótipo das mães pode nem sequer ser necessário [Lexer *et al.* 1999]; depois de removidos os contaminantes, verificaram uma elevada diferenciação genética entre famílias, e algum grau de consanguinidade dentro de famílias, atribuindo-se esta última à componente biparental de consanguinidade.

Heterogeneidade espacial

Os dados disponíveis apontam para uma limitada dispersão via semente, geralmente não ultrapassando a centena de metros, sem embargo de demonstrar-se imigração [Dow & Ashley 1997, Grivet *et al.* 2005, Valbuena-Carabaña *et al.* 2005]. Associando a este factor a tendência para diferenciação entre famílias documentada acima, esperar-se-ia uma distribuição espacial dos genótipos marcadamente não-aleatória.

A identificação dos genótipos dentro da população (primeira estratégia) permite obter medidas da tendência de agrupamento no espaço entre indivíduos aparentados geneticamente, nomeadamente a autocorrelação espacial, que numa população panmíctica não devem afastar-se do valor 0 em todas as classes de distância. Em geral é essa a situação que se encontra [Streiff *et al.* 1998], mas as circunstâncias que produzem valores significativamente diferentes são sugestivas: por um lado, um tamanho de amostragem adequado, diversificação do tratamento dos dados [Cottrell *et al.* 2003], refinamentos utilizando coeficientes de parentesco entre adultos, e diversas correcções, como para a orientação dominante dos ventos [Dutech *et al.* 2005]; por outro, as características da amostra, seja pela existência de limites topográficos à migração via semente [Chung *et al.* 2002, Cottrell *et al.* 2003] ou por tratar-se de indivíduos jovens [Müller-Starck *et al.* 1993, Dow & Ashley 1997, Chung

et al. 2002, Cottrell *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2003]. A utilização de marcadores nucleares ligados [Lexer *et al.* 2000] poderia em princípio tornar ainda mais evidentes os padrões espaciais dentro das populações, mas tem tido pouca aplicação.

Assim, para além da importância de aperfeiçoamento dos esquemas de amostragem e do tratamento dos dados [Vekemans & Hardy 2004], verifica-se que a aparente aleatoriedade de distribuição dos genótipos das populações adultas de *Quercus* não é uma propriedade da reprodução sexuada em si mesma — que pelo contrário tende a produzir uma diferenciação genotípica no espaço — mas sim a resultante de processos *a posteriori*, provavelmente de eliminação por competição intra-específica [Chung *et al.* 2002, Jensen *et al.* 2003], sendo que alguns autores vão ao ponto de postularem o envolvimento de selecção contra os indivíduos consanguíneos [Streiff *et al.* 1998, Fernández-M. & Sork 2005].

Note-se que a reduzida dispersão de sementes observada à escala duma população e num número limitado de gerações não exclui que ela possa alcançar grandes distâncias. Só assim se compreende a migração dos *Quercus* através de centenas de quilómetros de mar, evidente pela presença das duas subespécies de *Q. ilex* nas Baleares e da subespécie autónoma na Tunísia [Rothmaler 1941], entre tantos exemplos que se podem citar.

2) Hibridismo

Caracterização dos híbridos

Pela literatura botânica, parece claro que a identificação duma forma como sendo híbrida (entenda-se aqui como tendo progenitores directos indivíduos de duas espécies “boas”) passa por uma série de critérios bem estabelecidos [Coutinho 1888, Natividade 1936, Rushton 1993]: apresentação de caracteres morfológicos intermédios entre os das duas espécies, assim como os de uma e de outra no mesmo indivíduo, ocorrência em zonas de simpatria dessas duas espécies, e produção por reprodução sexuada de descendências segregando caracteres dessas espécies ausentes no híbrido.

No entanto, os marcadores genéticos têm sido pouco eficazes na resolução de problemas associados à definição do estatuto híbrido de certos *Quercus*. A maneira mais fácil de definir geneticamente um híbrido (F_1) entre duas espécies é ao nível de *loci* discriminantes, que sejam monomórficos em cada uma dessas espécies, pois deverá ser heterozigótico nesses *loci*, apresentando como alelos os que são representativos de cada uma (codominância); mas com o género *Quercus*,

na prática, o único exemplo desta definição é o de *Q. × morisii*, em *loci* isoenzimáticos [Oliveira *et al.* 2003, e presente trabalho] e nos segmentos ITS (*internal transcribed spacers*, pertencentes à região média ITS1–5,8S–ITS2 dos *loci* rDNA [Bellarosa *et al.* 2005]).

O estudo dos híbridos entre *Q. kelloggii* Newb. e *Q. wizlizenii* var. *frutescens* Engelm. (*Q. × moreha* Kell.) baseou-se em alelos de 6 *loci* isoenzimáticos, onde os alelos só presentes numa das espécies, quando ocorriam nos híbridos, permitiam excluir uma ou outra espécie e, por nunca estarem em homozigose, sugeriam estes serem F_1 (um método estatístico de máxima verosimilhança, não explicitado, concordou com essa interpretação); o facto de usarem apenas 27 indivíduos de cada espécie para definirem o elenco de variação poderia ser considerado insuficiente, e os desvios entre as frequências alélicas nos 13 híbridos e os valores esperados intermédios ao das espécies parecem indicá-lo, mas estes autores até consideraram o caso destes híbridos, em comparação com os doutros géneros analisados no mesmo estudo, relativamente simples por só serem F_1 s [Nason *et al.* 1992].

O nome *Q. crenata* Lam. é considerado um sinónimo de *Q. × hispanica* [Govaerts & Frodin 1998], também atribuído a Lamarck (figura 2.3), reflectindo a ambiguidade de concepções sobre o que se tem pensado ser um mesmo táxone com origem no hibridismo entre *Q. suber* e *Q. cerris*. Como *Q. crenata*, tratar-se-ia duma hibri-espécie (cf. parte I secção B), isto é, a partir dos híbridos originais teria segregado uma forma recombinante bem delimitada morfológicamente e “intermédia” entre as duas espécies que lhe deram origem; como *Q. × hispanica*, seria simplesmente o híbrido F_1 dessas duas espécies. A morfologia sugere ambas as interpretações para diferentes proveniências [Cristofolini & Crema 2005]: hibri-espécie quando fora da distribuição geográfica de *Q. suber* (norte da Itália e regiões próximas, na Eslovénia e na Croácia), e híbrido F_1 na Itália peninsular e Sicília, onde também ocorre *Q. suber*, notando-se uma maior variabilidade neste segundo grupo do que no primeiro, talvez um sinal de instabilidade do desenvolvimento característica de híbridos. O estudo dos ITSs do rDNA dum indivíduo do sul de Itália foi inconclusivo, apesar de existir uma deleção de 7 pares de bases (bp) partilhada apenas com *Q. suber* cuja heterozigose no híbrido, aparentemente, não foi verificada [Bellarosa *et al.* 2005]. Segundo Cristofolini & Crema [2005], só se conhecem indivíduos mais ou menos isolados (menos de duas centenas no total da sua distribuição), e sabendo-se que *Q. suber* já foi cultivado nas regiões nortenhas onde

actualmente não está presente, assim como pela ausência de regeneração junto dos *Q. × hispanica*, a hipótese de hibri-espécie postulada pelos dois grupos de autores parece improvável. As dificuldades de Bellarosa *et al.* [2005] podem ser atribuídas a limitações dos segmentos ITS, face à proximidade filogenética entre as espécies parentais, à variação intra-específica nestas e ao reduzido número de indivíduos analisados.

Recentemente, *Q. afares* Pomel (secção *Cerris*, que forma os híbridos *Q. × kabilica* com *Q. suber*, fig. 2.3), foi interpretada como hibri-espécie derivada do cruzamento entre *Q. suber* e *Q. canariensis* [Mir *et al.* 2006]. A existência de vários alelos discriminantes em relação a *Q. suber*, que não é habitual entre táxones da mesma subsecção, constitui um forte argumento a favor desta interpretação, a par de se conhecerem híbridos F_1 entre as duas espécies consideradas progenitoras (figura 2.3 [Vásquez 1998]), mas com base nos argumentos ecológicos utilizados teria de assumir-se que a linhagem iniciada nos híbridos originais se manteve isolada das espécies que supostamente lhe deram origem. Neste estudo é patente uma interessante demonstração da capacidade dos marcadores genéticos e estatísticas utilizados de reflectirem as relações filogenéticas entre os 3 táxones, com *Q. afares* a agrupar-se mais próximo de *Q. suber*.

Outras tentativas de demonstrar um estatuto híbrido com marcadores genéticos não foram bem sucedidas [Rushton 1993, Kremer & Petit 1993, Craft *et al.* 2002, Scotti-Saintagne *et al.* 2004, Kelleher *et al.* 2005]. Usando “Análise de Diferenças Representacional” para detectar à escala genómica *loci* discriminantes entre *Q. robur* e *Q. suber* (duas espécies que aparentemente não hibridam, fig. 2.3), apenas se detectaram sequências repetitivas (retroposões) que, infelizmente, não permitiriam discriminar *Q. robur* de *Q. petræa* [Zoldos *et al.* 2001].

Introgressão

A interpretação de introgressões não é menos problemática. Mesmo ao nível da morfologia (o padrão usado pelos taxonomistas) surgem ambiguidades, em grande parte atribuíveis ao polimorfismo ao nível das folhas mas também à análise estatística efectuada. Assim, verifica-se que o uso de populações de referência para a construção de funções discriminantes (e outras estatísticas) tende a empolar a proporção de indivíduos intermédios, ou porque essas populações não são representativas [Jensen *et al.* 2003], ou a moda duma espécie não se localiza no extremo do espectro de variação [Kelleher *et al.* 2004], ou simplesmente porque a classificação é mais eficiente com outras estratégias de tratamento dos dados, seja por maximização da variância

explicada [Dupouey & Badeau 1993] ou por distâncias genéticas entre indivíduos [González-Rodríguez & Oyama 2005].

A situação pode ser bastante complexa em casos como o dos híbridos designados *Q. subpyrenaica* (entre *Q. faginea* e *Q. pubescens*, donde o nome correcto seria *Q. × allorgeana*, figura 2.3) [Himrane *et al.* 2004]. Neles, tanto a morfologia (caracteres foliares e crescimento do tronco) como a fisiologia (caracteres hidráulicos) revelaram uma variação transcendendo os limites definidos entre as duas espécies, levando a considerar afinidades em termos fisiológicos com as duas espécies consideradas e ainda com *Q. robur*, talvez reflectindo, no contexto geográfico dos pré-Pirinéus em Espanha, uma grex destas 3 espécies e sob selecção disruptiva.

No caso de *Q. robur* e *Q. petræa* [Kremer *et al.* 2002] concluiu-se que os caracteres foliares não permitem em si uma resolução completa entre as espécies, porém sem darem evidência dum terceiro grupo com fenótipos intermédios, que deveria existir caso o hibridismo neste par de espécies fosse frequente como tende a assumir-se muitas vezes (note-se que, por causa da persistência de efeitos maternos incidindo nestes caracteres em plantas jovens, só se deve esperar um fenótipo intermédio em indivíduos adultos). Não é pacífico interpretar-se como sendo casos de introgressão os indivíduos estatisticamente intermédios, face à ambiguidade dos índices de hibridismo [Wilson 1992] e à bimodalidade observada nesse estudo. Nomeadamente, os critérios baseados apenas em folhas acabam por ser irrelevantes, em parte por não haver um limite objectivo em relação à variação intra-específica normal, mas de modo muito crítico pelo facto do mosaicismo de caracteres morfológicos das duas espécies, já presente nos híbridos F_1 , ser imprevisível nas descendências destes [Kremer *et al.* 2002, Kelleher *et al.* 2004].

Há que referir o facto da base genética da variação morfológica (exemplificada pelos QTLs entre *Q. petræa* and *Q. robur* [Saintagne *et al.* 2004]) não se correlacionar com os marcadores genéticos usados para sondar o hibridismo, como verificado em diversas abordagens [Craft *et al.* 2002, González-Rodríguez *et al.* 2004a, González-Rodríguez & Oyama 2005, Kelleher *et al.* 2005, Valbuena-Carabaña *et al.* 2005³], tornando problemática a interpretação destes últimos face à classificação pela morfologia. Dois desses estudos, aliás bastante semelhantes porque se

³ Ressalva-se a detecção dum marcador genético (*locus* nSSR 96) cuja diversidade reduzida e localização cromossómica próxima dum *locus* para morfologia foliar pode ser atribuída à selecção disruptiva entre *Q. petræa* and *Q. robur* [Muir & Schlötterer 2005]

observou em ambos uma proporção importante de indivíduos cuja identificação era contraditória entre critérios morfológicos e genéticos, ilustram as diferenças de interpretação possíveis neste contexto. No primeiro concluiu-se que a taxa de hibridismo (entre *Q. lobata* e *Q. douglasii* Hook. & Arn.) era muito baixa, e que a morfologia intermédia não é forçosamente sinal de hibridismo [Craft *et al.* 2002]; no segundo definiram-se margens arbitrárias de classificação com base nos genótipos para deduzir introgressão (probabilidade abaixo dos 95%, inclusive até próximo de 0%!, dum indivíduo estar de acordo com o carácter morfológico utilizado na identificação) e hibridismo F_1 (probabilidade entre 40 e 60%), para obterem perto de 9% de “introgredidos” (bidireccionalmente; trata-se de *Q. petræa* e de *Q. pyrenaica*) e 2–3% de híbridos F_1 [Valbuena-Carabaña *et al.* 2005], que parecem questionáveis pelo menos na metodologia utilizada.

Pelo exposto verifica-se que, para além das dificuldades metodológicas, tem de contar-se com a diversidade de pressupostos de diferentes autores sobre o fluxo genético entre espécies.

Fluxo genético interespecífico

Os exemplos melhor documentados de pares de espécies que hibridam entre si são, na Europa, *Q. robur* / *Q. petræa*, e na América, *Q. gambelii* / *Q. grisea* e *Q. laurina* Humb. & Bonpl. / *Q. affinis* Scheidw., e cada par em situações bastante diferentes dos restantes.

No primeiro [Kleinschmit 1993], têm-se duas espécies cujas distribuições geográficas abrangem regiões quase coincidentes, embora localmente se verifique uma especialização edafoclimática, com *Q. robur* a ocupar locais mais húmidos e “ricos” (supõe-se que edaficamente) e *Q. petræa* a preferir os mais secos e quentes; a formação de povoamentos mistos, pelo menos na Alemanha, é favorecida apenas onde a topografia abrange um mosaico de condições ambientais preferidas por cada uma das espécies; nestes povoamentos ocorre hibridismo com relativa facilidade, o que poderá eventualmente atribuir-se à oportunidade de polinização heterospecífica e ao desenvolvimento, previsível em resultado da dispersão via semente, em condições ecologicamente desfavoráveis. Como se descreveu anteriormente (secção C3, “emasculação ambiental”), é também em função de condições ambientais limite para *Q. gambelii*, em zonas de contacto com *Q. grisea*, que ocorre hibridação [Williams *et al.* 2001]. Esta inter-relação entre limites ecológicos e oportunidade para hibridação é um tema clássico [Dobzhansky *et al.* 1977, Nason *et al.* 1992, Valbuena-Carabaña *et al.* 2005], mas ao contrário de assumirem-se

“débeis mecanismos de isolamento reprodutor”, importa realçar o facto da hibridação, num par de espécies como no outro, só ser comum em condições ambientais bastante específicas, e mesmo nessas as tentativas de estimar uma taxa de hibridação espontânea no primeiro mostram valores em geral modestos (que serão revistos mais adiante).

No par *Q. laurina* / *Q. affinis*, a hibridação pode não relacionar-se com condições-limite ambientais. A distribuição das duas espécies é apenas parcialmente sobreposta, sendo que a diferenciação morfológica, baseada em poucos caracteres mas nítida entre populações das regiões alopátricas, se esbate nas zonas de contacto [González-Rodríguez *et al.* 2004a, González-Rodríguez & Oyama 2005]. A hipótese que estas duas espécies se diferenciaram alopatricamente, em cadeias montanhosas afastadas entre si, para depois, em resposta a climas mais frios, começarem a expandir para zonas de menor altitude onde entraram em contacto secundário [González-Rodríguez *et al.* 2004a], permitiria considerar que se trata de espécies incipientes. Como discutido na parte I, secção A2, pelos critérios bio-sistemáticos a relativa facilidade de hibridação pode correlacionar-se com um nível infra-específico de subdivisão⁴. Segundo A. González-Rodríguez (comunicação pessoal), existem pelo menos mais 2 táxones que parecem ser mais próximos de *Q. laurina* que *Q. affinis*, com numerosas e complexas reticulações envolvendo o conjunto das quatro; mesmo que a diferenciação entre estas duas se deva a um pequeno número de *loci* sujeitos a selecção disruptiva, esse autor considera que se diferenciam ao nível de espécie. O mesmo tipo de dúvida se tem colocado quanto às duas formas que se denominam azinheira, e que hibridam entre si com facilidade em zonas de contacto [Sadaka-Laulan & Ponge 2000], prevalecendo em muita literatura a ideia de que são espécies diferentes [Rothmaler 1941, Kleinschmit 1993, Govaerts & Frodin 1998] (cf. Apêndice II secção F). Infelizmente, não há critérios objectivos para estas interpretações (cf. parte I secção A2).

Interpretação dos marcadores nucleares de hibridismo

O estudo de Bacilieri *et al.* [1996] é frequentemente citado como demonstração da tendência de hibridação assimétrica entre *Quercus robur* e *Q. petraea*, na qual as flores femininas da primeira espécie seriam fertilizadas por pólen da segunda em percentagens muito consideráveis

⁴ O que está na base de propor-se que *Q. robur* e *Q. petraea* são subespécies [Kleinschmit & Kleinschmit 2000], mas como discutido acima os cruzamentos manipulados que servem de base a esta proposta não parecem condizer com a situação natural. E, segundo os dados filogenéticos disponíveis, estas duas espécies não são muito próximas entre si [Bellarosa *et al.* 2005].

(48%, pela estimativa baseada nas plantas de *Q. robur*). O resultado fundamental deste estudo foram as observações de variação das frequências em 7 *loci* enzimáticos durante um ciclo reprodutor (adulto – semente – planta jovem); assinalando que algumas variações muito significativas das frequências, nas sementes e plantas derivadas de óvulos de *Q. robur*, eram no sentido das frequências características dos adultos de *Q. petræa*, os autores interpretaram-nas como evidência desse hibridismo. No entanto, tal interpretação é muito duvidosa (e o considerável trabalho de análise estatística que nela radicou não teria, assim, qualquer significado), visto que em paralelo se observavam variações semelhantes nos descendentes derivados de óvulos de *Q. petræa* (predominância de “genótipos extremos” desta espécie), como ilustra a figura 2.7.

Assim, o que para Bacilieri *et al.* [1996] são taxas de hibridismo, mais não é do que medidas de flutuação de frequências, intra-específicas, dentro de um ciclo de vida.

A análise feita pelo mesmo grupo dum povoamento misto destas duas espécies, mas com marcadores nSSR [Streiff *et al.* 1999], determinou que, em 310 descendentes de pólen de progenitores genotipados, 23 formaram-se com pólen heterospecífico; no entanto, 16 desses híbridos descendiam do indivíduo B (*Q. petræa*), totalmente rodeado por *Q. robur* de tal maneira que só 5 descendentes de B descendiam de pólen conspecífico do mesmo povoamento. Esta taxa de 70% de hibridismo intrapovoamento (16 em 21) reflecte sem dúvida a importância das árvores mais próximas e, por extensão, a da topografia, na promoção do hibridismo entre *Quercus*. Assim, uma melhor aproximação à verdadeira incidência de hibridismo teria de fazer-se sem os dados da árvore B, dando $7/289 = 2,4\%$, mas como apenas se trata das polinizações intrapovoamento (649 descendentes derivaram de pólen de origem exterior, não se sabendo nesses casos a espécie) este número será provavelmente uma estimativa por excesso. Tem-se assim uma indicação adicional que as taxas elevadíssimas propostas por Bacilieri *et al.* [1996] se baseiam em pressupostos errados, como discutido acima. Por sinal, a identidade da planta B constitui um contra-exemplo para o observado com polinizações controladas, onde se assume que a direcção preferencial de hibridação é a oposta, isto é, ser mais frequente haver hibridação envolvendo pólen de *Q. petræa* em flores femininas de *Q. robur* (cf. secção C3). O facto dessas polinizações não envolverem misturas de pólen das duas espécies tornam as taxas de sucesso na hibridação irrelevantes.

A verificação duma baixa taxa de hibridismo entre *Q. robur* e *Q.*

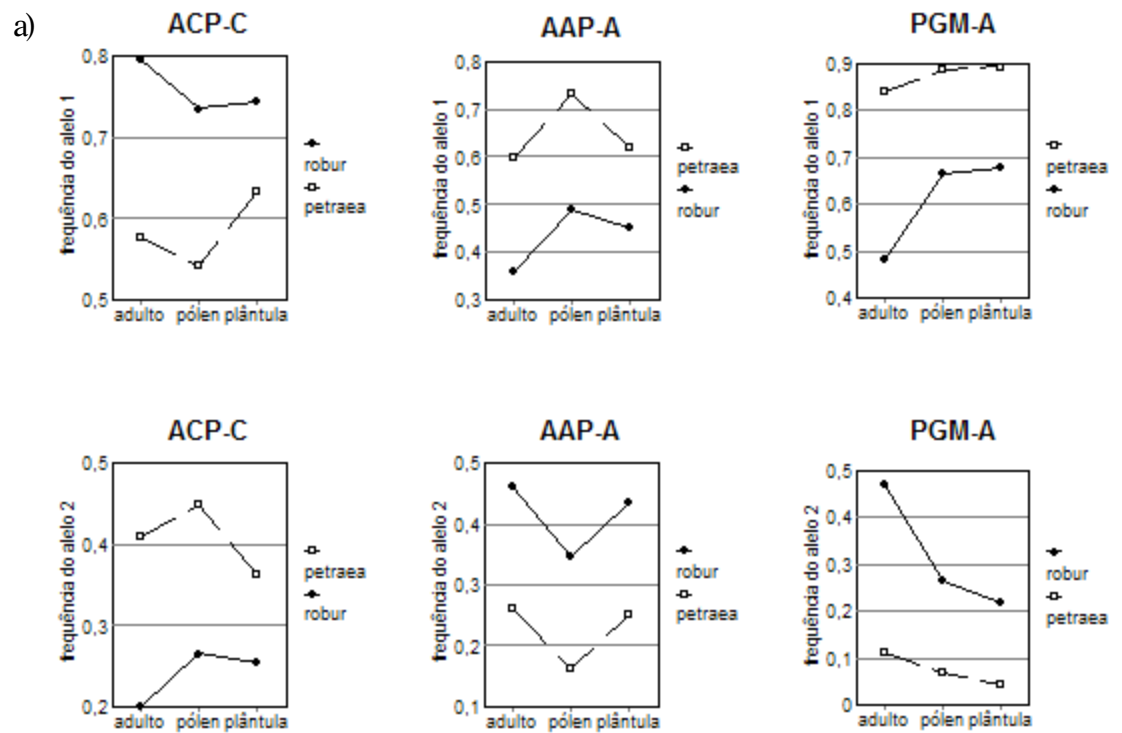


Figura 2.7 — Frequências desde o adulto até à plântula, nos 3 loci de *Q. petraea* e *Q. robur* com maiores flutuações [Bacilieri *et al.* 1996]. As frequências no pólen foram deduzidas a partir dos genótipos das sementes, por referência aos das árvores donde foram colhidas. Separam-se as ilustrações para cada um dos dois alelos mais frequentes (1, 2) de cada locus. A significância das diferenças de frequência referem-se às frequências nos adultos na mesma espécie. a) locus ACP-C (diferenças não-significativas); b) locus AAP-A (significativas no pólen das duas espécies); c) locus PGM-A (significativas nas plântulas das duas espécies, e no pólen de *Q. robur*).

petraea, baseada em vinte loci nSSR [Muir & Schlötterer 2005], só seria compatível com a presença dos mesmos marcadores genéticos nas duas espécies (e nas mais variadas proveniências) se mantida por fluxos genéticos interespecíficos bastante intensos; a melhor explicação dada pelos autores foi (excluindo tratar-se de homoplasias) a persistência de polimorfismos anteriores à especiação.

DNA citoplásmico

É na suposição de que vários pares de espécies hibridam entre si frequentemente que se inserem algumas sugestões de explicação para os intrigantes resultados obtidos com DNA citoplásmico em *Quercus*. Estes marcadores genéticos parecem não ser alvo de qualquer forma de recombinação, deste modo fixando como introgressão o DNA citoplásmico duma espécie que tenha sido polinizada por outra e, com a intervenção do pólen desta segunda espécie, produza populações morfologicamente indistinguíveis do “tipo” botânico desta última. Praticamente todas as espécies europeias da secção *Quercus* que foram

analisadas partilham 3 ou mais haplótipos de DNA citoplásmico entre si [Dumolin-Lapègue *et al.* 1997a, Petit *et al.* 2002], a tal ponto que a filogeografia no grupo (traçamento das rotas migratórias desde a última glaciação) só pode ser de haplótipos e não de espécies.

Quando se analisa a variação do DNA plastidial a uma escala geográfica intermédia, observa-se um fenómeno de colocação de haplótipos de diferentes espécies, como foi primeiro documentado numa região do oeste de França (com cerca de 50000 Km²) com numerosos povoamentos mistos de *Q. robur* e *Q. petraea* [Petit *et al.* 1997]: embora houvesse no conjunto 6 haplótipos plastidiais diferentes, em cada povoamento misto observava-se em geral um único haplótipo, comum às duas espécies (tabela 2.1 [Petit *et al.* 1997]).

Segundo esta hipótese, que é discutida em grande detalhe num trabalho recente [Petit *et al.* 2003], os povoamentos foram iniciados por *Q. robur* (espécie ecologicamente mais pioneira que *Q. petraea*), em vagas de colonização independentes após o recuo dos gelos da última glaciação, de tal modo que actualmente cada povoamento tem praticamente um único haplótipo plastidial; a seguir, o pólen de *Q. petraea* poderia dar origem a híbridos com os *Q. robur* nestes povoamentos, a partir dos quais, em sucessivas gerações de retrocruzamento com pólen de *Q. petraea*, e presumindo-se selecção disruptiva com uma melhor adaptação dos carvalhos mais “puros” (incluindo a sua tolerância ao ensombramento por *Q. robur*), se instalariam os antecessores dos actuais *Q. petraea* — estes, então, seriam típicos da espécie excepto pela introgressão do DNA plastidial de *Q. robur*, que testemunha a ocorrência de hibridismo como evento iniciador da colonização por *Q. petraea*.

Num trabalho subsequente, o mesmo processo foi invocado para explicar padrões de aparente introgressão entre *Q. suber* e *Q. ilex* ssp. *rotundifolia* [Belahbib *et al.*, 2001], desta vez com o termo “captura nuclear”, mais tarde dando lugar ao de “submersão polínica” (*pollen swamping*) [Petit *et al.* 2003]. A partilha de haplótipos plastidiais, e a tendência para cada haplótipo coexistir em diferentes espécies nos mesmos locais, tinham sido observadas primeiro na secção *Albæ* [Whittemore & Schaal, 1991] e foram descritos recentemente vários casos semelhantes, com maior ou menor complexidade [Bordács 2000, Collada *et al.* 2002, Finkeldey & Mátyás 2003, González-Rodríguez *et al.* 2004b, Lumaret *et al.* 2005]; porém, nem sempre se trata de espécies que se conformem com os requisitos da hipótese original [Petit *et al.* 1997] e ainda menos com o conjunto de factores ecológicos enumerados, especificamente para o par *Q. petraea* / *Q. robur*, para o sucesso da

“submersão polínica” [Petit *et al.* 2003], a qual só se concebe dentro dum pressuposto de facilidade de hibridação que, mesmo para este par de espécies, é duvidoso.

Tabela 2.1 — Colocalização de haplótipos de DNA plastidial idênticos entre as espécies *Q. robur* e *Q. petraea*. Combinações de haplótipos entre árvores nas mesmas parcelas, evidenciando uma larga maioria de parcelas ($\approx 115/137$) onde as duas espécies têm o mesmo haplótipo. Os casos sem correspondência referem-se a análises apenas duma das espécies [Petit *et al.*, 1997].

		Haplótipos em <i>Q. petraea</i>						s/ corresp.
		1	2	3	4	5	6	
Haplótipos em <i>Q. robur</i>	1	64	3	3	3	1	0	7
	2	1	26	0	2	0	0	15
	3	3	3	≈ 20	0	0	0	2
	4	3	1	1	5	0	0	7
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	1	0	0	0	0	0	0
s/ corresp.		6	1	1	2	0	0	

A tendência de colocalização de haplótipos de espécies aparentadas é, contudo, um fenómeno bem estabelecido e, a não ser levado em conta, pode dar azo a erros grosseiros de interpretação filogenética [Lumaret *et al.* 2005]. Quanto à possibilidade do polimorfismo destes marcadores anteceder a especiação [González-Rodríguez *et al.* 2004b] pode ter alguma validade, mas em si não explica a diferenciação geográfica ser por haplótipos e não por espécies.

Toda esta situação com os marcadores de DNA plastidiais tem dado origem a afirmações pouco credíveis, como por exemplo “ser opinião corrente” que os genes nucleares não são tão facilmente trocados entre espécies de *Quercus* como os citoplásmicos [Zoldos *et al.* 2001], ou proporem-se [Belahbib *et al.* 2001] “trocas citoplásmicas frequentes” (sem as quais a submersão polínica não funcionaria) entre espécies que “não são muito aparentadas” (preconceito relacionado com o esquema taxonómico da *Flora Europaea*, cf. parte I secção A2).

A que parece ser a melhor explicação para estas observações entronca no conceito de multi-espécie [Burger 1975], especialmente plausível nos refúgios glaciares, onde seria comum haver indivíduos isolados dos da mesma espécie, ou em condições de emasculação ambiental, de tal modo que a reprodução sexuada poderia facilmente envolver hibridismo — e ocasionalmente ser essa a única possibilidade para além da

autopolinização. Ao fim de várias gerações nessa situação, e com a fixação por deriva (que é maior nos genes transmitidos uniparentalmente), é plausível que se desse a uniformização do haplótipo em cada refúgio; quando houvesse nova expansão e se fosse restabelecendo (por selecção disruptiva) a primitiva diferenciação entre espécies, as populações na mesma rota de migração teriam retido a marca da sua origem geográfica comum (refúgio glacial) no seu DNA citoplásmico [Valbuena-Carabaña *et al.* 2005]. Esta explicação já havia sido avançada para a partilha de marcadores AFLP (nucleares) entre três espécies da secção *Stenocarpæ* [Kashani & Dodd 2002].

Uma das propriedades interessantes do DNA citoplásmico é permitir verificar, em teoria, se o fluxo genético interespecífico tem um sentido preferencial ou é bidireccional, independentemente de quando se tenha dado. O exemplo mais notável desta inferência é do par *Q. suber* / *Q. ilex*, pois é frequente encontrarem-se haplótipos ‘ilex’ no primeiro mas não vice-versa, indicando que o hibridismo se processaria preferencialmente entre pólen de *Q. suber* e flores femininas de *Q. ilex* [Belahbib *et al.* 2001, Collada *et al.* 2002, Jiménez *et al.* 2004]. Embora a evidência de polinizações controladas neste par deva ser interpretada com precaução (cf. secção C3), ela é concordante [Boavida *et al.* 2001], o mesmo podendo dizer-se quanto a identificarem-se os haplótipos presentes em *Q. afares* como sendo de *Q. suber* [Mir *et al.* 2006], os de *Q. × fagineomirbeckii* de *Q. faginea* [Morales *et al.* 2005] e, talvez, os de *Q. petræa* como sendo de *Q. robur* [Petit *et al.* 2003].

Parte III: Híbridos de sobreiro com azinheira em Portugal e na Bacia Mediterrânica

A — Perspectiva histórica do problema

A formação de híbridos entre duas espécies requer uma sobreposição geográfica, entre populações dessas espécies, mais ou menos extensa (por outras palavras, as espécies devem ser parapátricas ou simpátricas). No caso do sobreiro e da azinheira (doravante este termo refere-se à subespécie *rotundifolia*, excepto onde se expresse o contrário), a ocorrência de ambas em Portugal, Espanha, França, Marrocos e Argélia permite em princípio esse contacto, como aliás o confirma Natividade

[Subericultura⁵ pp. 37–73] e vem documentado mais recentemente [Toumi & Lumaret 1998]⁶. Porém, as exigências ecológicas de cada uma são bastante diferentes, levando a que esse contacto, pelo menos em condições naturais, deva ser muito limitado: assim, em comparação com a azinheira, o sobreiro é menos tolerante à secura e ao frio intenso, além de ser calcífugo [Bellarosa 2003], enquanto a azinheira evita locais com maior humidade, para o que deve contribuir, pelo menos em parte, uma maior susceptibilidade ao parasitismo em condições de alagamento [Sánchez *et al.* 2005]. Talvez se possa considerar que as distribuições quase disjuntas registadas no Magrebe [Bernard 1937], pela presumível ausência de políticas de povoamento sistemático por qualquer uma das espécies, sejam um testemunho da presumível tendência destas duas espécies para não ocorrerem nos mesmos locais.

Em Portugal o sobreiro e a azinheira coexistem numa extensa faixa de sobreposição *grosso modo* equivalente à transição entre as regiões submediterrânica e iberomediterrânica (número 21 na legenda da Carta Ecológica de Portugal Continental [Albuquerque 1982]), que abrange áreas importantes desde a Beira Baixa até ao Algarve, para além doutras zonas mais limitadas, nomeadamente em Trás-os-Montes e Alto Douro. Esta vasta sobreposição é facilitada pela intersecção entre os nichos climáticos de ambas as espécies [M'Hirit 1999] e terá sido mais ou menos importante consoante as tendências históricas [Subericultura pp. 39–49], mas a sua actual vastidão parece resultar sobretudo de evoluções bastante recentes, isto é a partir do final do século XIX, no que respeita ao aproveitamento dos terrenos na metade Sul do território continental.

Até ao século XVIII, isto é, antes da generalização do uso do vidro no engarrafamento das bebidas, o interesse do sobreiro residia essencialmente no aproveitamento do lenho (construção naval e carvão), não-renovável, e ainda o do entrecasco (curtimento) e da cortiça virgem (flutuadores), de valor secundário em relação à exploração da bolota doce, entre outros usos, da azinheira [Natividade 1947, Mendes 2002, Coelho 2003]⁷. A situação de recuo do sobreiro na bacia hidrográfica do

⁵ Nesta parte da revisão bibliográfica refere-se a obra *Subericultura* de Vieira Natividade [Natividade 1950] pelo seu título e pelo número de página respectivo.

⁶ Contacto análogo com a subespécie *ilex* dá-se também no Sul de Itália [Bellarosa *et al.* 2005] e, possivelmente, na Tunísia [Bernard 1937, Rothmaler 1941].

⁷ Vem a propósito notar que Brotero associa o termo montado apenas à azinheira (no item *Quercus ilex* assim como no *Q. rotundifolia*, que se sabe actualmente tratar-se apenas da subespécie *rotundifolia* [Vasconcelos e Franco 1954]), e não ao sobreiro (*Q. suber*), o qual se

Tejo, motivado pela procura de lenha para carvão [Natividade, 1947] assim como pela construção civil que se seguiu ao terramoto de 1755 [Mendes 2002], teria provavelmente retirado o sobreiro de qualquer contacto que tivesse tido com os montados de azinho no início do século XIX. Mas a escassez da cortiça amadia para a indústria vinícola nas primeiras regiões de produção de rolha, sobretudo a Catalunha, deu origem a uma procura deste recurso renovável, que foi aumentando ao longo do século XIX, com um melhoramento progressivo da gestão dos povoamentos [Subericultura p. 46], embora parcimoniosamente [Mendes 2002], só havendo a certeza duma expansão da sua área geográfica a partir do terço final do século XIX, passando-se de 121000 ha em 1867 para 651400 ha em 1950 [Mendes 2002, Coelho 2003], no que teve paralelo na azinheira até à chamada campanha do trigo (os terrenos incultos no Alentejo desapareceram praticamente no final do século XIX), sempre na sombra do interesse na produção cerealífera e em estreita dependência da mão-de-obra seareira, que também era aproveitada para a extracção da cortiça [Mendes 2002]. O consequente aumento do “capital suberícola” português distingue-se completamente da expansão do pinheiro bravo (*Pinus pinaster* Ait.) nas três primeiras décadas do século XX, comparativamente repentina [Mendes 2002], e expressa-se no aumento de produção e exportação de cortiça a partir das décadas à volta de 1900 [Subericultura p. 49, Raposo s.d.⁸ p. 97], assim como na sua progressiva estabilização a partir dos anos 40 do século XX [Raposo s.d.⁸ apêndice F (2º)], com um máximo de extracção de cortiça virgem a registar-se nos anos 60 [Mendes 2002].

Segundo Raposo [s.d.⁸ pp. 94–95], este desenvolvimento veio na sequência da reabilitação dos solos com a aplicação sistemática de superfosfato de Cálcio, orientada para a produção de cereal mas que, com o declínio desta produção que se seguiu, deu a indicação, através da vigorosa regeneração espontânea de sobreiro que se observava, do porquê da anterior incapacidade desses solos para sustentarem arvoredos, o que acabou por ser uma realização da “profecia” de Barros Gomes em 1875, duma recuperação da antiga dominância do sobreiro (e azinho) no Alentejo, à altura restrito a pequenos povoamentos [Neves 1944, Raposo s.d.⁸ p. 96]. Morais considerava que a distribuição do sobreiro que se observava diferia substancialmente daquela onde naturalmente predominaria, pela

apresentaria disseminado pelo país, embora principalmente no Sul [Broteri 1804].

⁸ s.d., sem data; o prefácio do autor situa-se em Dezembro de 1977.

cedência do seu terreno de anterior domínio, próximo do litoral a Norte do Tejo, para o pinheiro-bravo, mas tornando-se abundante em zonas de azinheira [Morais 1940]. Como complemento desta ideia, Amorim Girão [1942] apresentou um mapa dos topónimos portugueses relacionados com o sobreiro, e cuja concentração em Entre Douro e Minho, nas bacias do Mondego e do Zêzere, e na Estremadura, sugere uma distribuição em tempos antigos muito diferente da actual, resultando essa diferença do depauperamento das áreas florestais nessas zonas, para favorecer a agricultura e o povoamento [Subericultura pp. 43–44], por um lado, e pela expansão no Sul que, como acaba de apontar-se, seria relativamente recente.

Entretanto, a expansão do sobreiro nas regiões interiores de Portugal, para a produção de cortiça amadia, não desalojou a azinheira porque esta última reteve, até bastante tarde no século XX, o interesse económico que já tinha, ao qual se acrescentou cada vez mais a produção de carvão [Nogueira 1978, Coelho 2003], factor ao qual se pode ainda associar a garantia de salvaguarda económica que conferia às explorações a melhor resistência da azinheira aos rigores climáticos das regiões interiores. Assim, a extensão actual dos montados mistos terá sido a resultante dum compromisso entre a busca de rendimentos dum novo produto (a cortiça amadia) e a manutenção das fontes de rendimento anteriormente mais relevantes.

Embora as ligue uma relação causa-efeito, também é inegável a desproporção entre a actual extensão de montados mistos de sobreiro e azinheira em Portugal e a ocorrência espontânea dos híbridos entre estas duas espécies: face às oportunidades de hibridação nesses montados, esta deve considerar-se rara, mesmo descontando a possível contribuição de eventuais desbastes selectivos para estas árvores. Tendo em vista a marcada contracção da área com sobreiro e a predominância de terrenos incultos até ao terço final do século XIX, a sobrevivência de linhagens derivadas de híbridos anteriores à exploração intensiva da cortiça amadia deve ter sido excepcional. Ou seja, a considerar-se a introgressão de genes de azinheira nos sobreiros actuais, ela não é particularmente antiga: à escala do ciclo reprodutor do sobreiro (mínimo de 15–20 anos para frutificar, com muita irregularidade da produção de semente [Subericultura p. 103]), as linhagens híbridas formadas a partir da expansão do sobreiro, a existirem, remontam a menos de 8 gerações, e provavelmente o real número tenderia a ser muito inferior. Daí que a introgressão de azinheira em sobreiro, onde possa existir, tenderá assim

a ser ainda elevada (depois de uma geração de retrocruzamento com sobreiro é em média, teoricamente, 25%, após duas gerações 12,5%, etc., mas ver Apêndice II secção D). Estes pressupostos contrastam com a linha de raciocínio de Natividade, quando justificava o polimorfismo nos sobreiros na variedade de combinações genotípicas que podem resultar das linhagens destes híbridos, após “inumeráveis” gerações [Natividade 1934 p. 126].

B — Implicações silvícolas e “peso” no sector

1) A produção de cortiça e o problema da qualidade

Estima-se que actualmente o sector da cortiça movimente em Portugal cerca de 900 milhões de Euros anuais, com uma taxa de cobertura exportação/importação de 640% [DGF 2003]. Com base no Inventário Florestal, estima-se que a produção em Portugal ronde as 105 mil toneladas anuais, cerca de 50% do total mundial, quota que atinge os 80% no que respeita à transformação, da qual 95% é exportada [DGF 2003]. Apesar deste excedente de procura por parte da indústria transformadora, a evolução dos custos de exploração e a necessidade de planear com décadas de avanço leva os diversos interessados no sector primário a preocuparem-se com a sustentabilidade desta exploração. As razões são várias, muito em função das perspectivas de cada um:

- Substituição da cortiça para a indústria vinícola por materiais alternativos (nomeadamente rolhas de plástico ou de alumínio) e consequente redução da procura;
- Declínio de produção da cortiça amadia por envelhecimento dos montados e falta de regeneração;
- Prejuízos associados à exploração de sobreiro, provocados seja por doenças e pragas, seja por introdução de germoplasma criado em viveiro sem controlo das proveniências, com os consequentes problemas de adaptação;
- Substituição do sobreiro, nas áreas onde actualmente se encontra distribuído, por outros tipos de exploração.

A complexidade destas preocupações torna o futuro da exploração da cortiça em Portugal problemático. Mas se há factor que é relevante para todas elas, é a qualidade da cortiça produzida. Embora se reconheça não existirem ainda materiais alternativos para o rolhamento de bebidas engarrafadas que a igualem sequer, isso não quer dizer que a superioridade da cortiça seja relevante apenas para os vinhos de eleição; aliás, uma maior quota de cortiça de boa qualidade para rolhamento,

tendo em atenção que se trata dum mercado com grande procura e que tende a manter-se como tal, manterá por via da confiança a preferência pela cortiça, sem forçosamente haver uma queda significativa de preços — caso contrário, irá aumentando o risco duma mudança irreversível na orientação do consumo, com a progressiva adopção dos materiais alternativos. Sendo Portugal o mais importante país produtor de cortiça, cabe-nos um papel de grande responsabilidade no acautelamento de tendências negativas do mercado mundial.

Apesar da rentabilidade da exploração da cortiça e do apego de muitos produtores ao sobreiro, a motivação para manterem este uso do solo de que são proprietários não é um dado garantido. Cita-se principalmente a perda irreversível dessa rentabilidade por falta de regeneração dos povoamentos, apesar de poder pensar-se que não é preocupação urgente tendo em conta o longo ciclo de produtividade das árvores, potencialmente de 15 a 20 tiradas de cortiça amadia antes de começarem a entrar em declínio (mas pode ser até menos [Subericultura pp. 162–164]): as árvores que pela idade vão ficando menos produtivas constituem um impedimento para que as árvores jovens se desenvolvam, ou seja, se aquelas não forem abatidas não há regeneração natural, menos ainda por causa do pastoreio que sempre caracterizou a exploração em sistema de montado. Em função disso, Vieira Natividade preconizava uma gestão dos povoamentos orientada para a sustentabilidade da produção, através dum cuidadoso programa de desbastes, enquadrado por inventário minucioso, para conseguir-se uma distribuição uniforme dos sobreiros pelos sucessivos estádios do seu desenvolvimento [Subericultura pp. 217–218, 235]. Tais desbastes seriam ainda um ensejo para a selecção das árvores com melhor potencial de qualidade. Sem dúvida racional, esse modelo de gestão não é possível hoje — o abate não é permitido senão em situações muito estritas — mas não deixa de haver sugestões potencialmente eficazes que passam pela protecção rotativa da regeneração face ao pastoreio, parcela a parcela [Varela et al., 2003b]; e acrescenta-se o problema já antigo das dificuldades para a sobrevivência das árvores jovens, decorrentes da degradação dos solos [Subericultura pp. 124–125]. Talvez por isso, e apontando a crescente decrepitude dos montados de sobreiro (puros ou mistos) como uma ameaça para o futuro da produção de cortiça, os produtores insistam numa maior liberalização do abate. Tendo em conta a rentabilidade do modelo de exploração dos montados e a manutenção da procura de cortiça de qualidade, essa pretensão não deverá justificar quaisquer receios de vir a ser, pelo menos

para a esmagadora maioria dos produtores, um meio de substituir a produção de cortiça por outros usos do solo.

Por outro lado, é de certa forma irónico que o desinteresse de alguns proprietários pela produção de cortiça, quando associado a quebras de rendimento, se prenda com práticas incorrectas que contribuem para a susceptibilidade a doenças ou outros condicionantes da fisiologia das árvores, comprometendo gravemente a quota de cortiça de qualidade extraída [Nogueira 1978]. Este desinteresse encontra-se também entre os que preferem plantações de espécies de crescimento rápido que sejam ecologicamente compatíveis com as áreas actualmente cobertas por sobreiro, já não falando de outros usos do solo mais apetecíveis a curto prazo, e é um factor a ter em conta na evolução do sector.

O insucesso das plantações de sobreiros criados em viveiro também merece muita atenção. Para além da questão de serem mais ou menos correctamente projectadas, e mantidas de acordo com boas práticas, há o problema da adaptação aos locais definitivos, não só pelo facto de tratar-se frequentemente de solos sem passado florestal recente (caso das muito significativas áreas englobadas pela directiva comunitária da Política Agrícola Comum 2080/92), mas também pelo potencial de cada genótipo face às condições disponíveis. A proveniência do germoplasma não tem sido devidamente controlada, sendo provável que muito do material plantado tenha tido origem em regiões muito diferentes, inclusivamente do estrangeiro. O previsível insucesso de muitas plantações representa, para além dos prejuízos económicos directos, mais uma fonte de desmotivação para o cultivo do sobreiro.

2) *Nature vs. nurture* da qualidade da cortiça

A qualidade da cortiça define-se consensualmente pelo ponto de vista da sua aplicação industrial mais nobre, que é a produção de rolhas para o engarrafamento de vinhos [Vásquez 2002, González-Adrados *et al.* 2000]. Dentro de margens normais de densidade, dureza e elasticidade (embora esta última só ganhe em ser maximizada), o critério principal para a avaliação das cortiças pelos escolhedores ligados a essa produção é a sua porosidade [Pereira 1998]. A melhor cortiça para rolhas tem uma baixa porosidade que garante a possibilidade de maturação dos vinhos após engarrafamento e a necessária longevidade desse engarrafamento. À medida que as características da cortiça se vão afastando deste padrão, ela é menos valorizada. Natividade [Subericultura pp. 105, 176] exemplificou a distribuição da cortiça tirada em duas parcelas de 1 ha (figura 2.8), que patenteia a grande variação em cada local assim como

a proporção minoritária de cortiça de boa qualidade [Ferreira *et al.* 2000]. Ainda segundo Natividade, de toda a cortiça extraída em Portugal cada ano, apenas 30% tinha a qualidade requerida para a produção de rolhas. Distribuições como as da figura 2.8 levam a concluir que a obtenção de populações produtoras apenas das melhores cortiças teriam de resultar numa forte intensidade de selecção.

Embora os desbastes, que em todo o caso serviam também para uma gestão racional dos povoamentos, sejam uma forma de selecção [Subericultura pp. 104, 236], não se pode considerar que houvesse alguma vez melhoramento genético para a qualidade da cortiça. Aliás, logo que se tornou possível o aproveitamento integral da produção (incluindo o refugo e as aparas) para a indústria de aglomerados, associado a um declínio dos preços, mesmo os esforços de selecção por via dos desbastes foram interrompidos.

A porosidade aumenta com o volume ocupado pelos canais lenticulares da cortiça, o qual por sua vez depende do número de lentículas por unidade de área de entrecasco e do calibre dos canais [Subericultura p. 179, González-Adrados *et al.* 2000, Vásquez 2002]. Apenas o primeiro destes factores (isto é, o arranjo lenticular do entrecasco) parece ter uma forte base genética, pelo menos a julgar pela sua relativa constância em cada árvore, independentemente da altura no tronco, da idade (e/ou número de tiradas anteriores), etc.. As lentículas diferenciam-se, durante a primeira formação do câmbio suberofelodérmico, sob câmaras estomáticas na epiderme do ramo jovem [Subericultura p. 99]. Para obviar à espera de 35-40 anos até extrair-se a cortiça secundária, que é

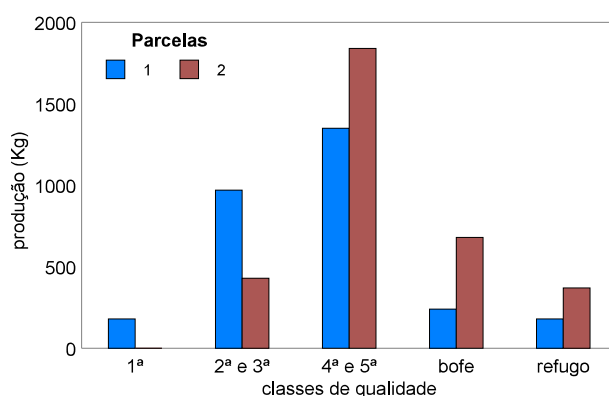


Figura 2.8 — Distribuição da produção de cortiça, em duas parcelas de 1 ha, por classes de qualidade [Subericultura p. 105]. Trata-se, na parcela 1, dum exemplo de bom arvoredo em região produtora de boa cortiça, e na parcela 2, dum exemplo onde apenas houve desbastes selectivos visando reduzir a proporção de cortiças de má qualidade.

quando em definitivo se avalia o valor dum árvore em termos de qualidade da cortiça, pode fazer-se uma avaliação precoce utilizando análise de imagem em cortes transversais de ramos jovens: um maior desenvolvimento do entrecasco nos de mais de 1 ano, e da cortiça virgem nos de diâmetro inferior a 1 cm, correlaciona-se com maior porosidade [Vásquez 2002]. A espessura do entrecasco ou, mais precisamente, do floema inactivo, determina a profundi-

de onde a partir deste se regenera o felogénio traumático, após descortiçamento, o que para providenciar o necessário arejamento requer lentículas de diâmetro maior, embora a superfície de contacto com os raios medulares do lenho, também variável entre árvores, contribua para facilitar as trocas gasosas [Vásquez 2002].

Muitas cortiças da melhor qualidade têm numerosos canais lenticulares mas de reduzido diâmetro, resultando na sua baixa porosidade, por isso não se atribui a este factor uma relevância determinante da porosidade da cortiça [Subericultura pp. 164–165], quando comparada com factores ambientais como por exemplo os que influenciam a intensidade de crescimento da cortiça: as temperaturas, a mobilização do solo, a captação da luz e da água, e de nutrientes do solo, o parasitismo, etc.. Não são as condições mais propícias à actividade vegetativa do sobreiro [Natividade 1939], nomeadamente a disponibilidade hídrica [Vásquez 2002], as que coincidem com as da cortiça de melhor qualidade, daí que as regiões mais expostas à influência marítima não produzam cortiças de 1^a e 2^a qualidade, e que nas regiões montanhosas com povoamentos mais densos, onde o crescimento da cortiça é menos intenso, a porosidade tenda a ser menor [Subericultura p. 179]. Em Portugal, uma grande parte dos povoamentos com cortiça de melhor qualidade situam-se nas regiões de contacto com as azinheiras, e embora pareça haver uma correlação negativa entre essa qualidade e as condições mais propícias à actividade vegetativa do sobreiro, é uma questão ainda por resolver [Vásquez 2002].

A reduzida porosidade das melhores cortiças não as faz substancialmente mais densas, aliás, é no refugo que as cortiças mais densas, e concomitantemente duras, são colocadas. Aparte os casos em que os anéis suberosos depositados anualmente são demasiado delgados e com paredes celulares espessas, o que em Portugal apenas se encontraria em sobreiros muito velhos [Subericultura p. 181], a densidade elevada resulta de inclusões lenhificadas que caracterizam as cortiças preguntas ou madeirentas, cujo desenvolvimento é anómalo e poderá atribuir-se a factores genéticos, mas através de processos não relacionáveis com as causas de porosidade (cf. secção 3).

Para além das tendências regionais já referidas, que se relacionam com as condições edafoclimáticas e os modelos de exploração que as caracterizam, grande parte da variação na qualidade da cortiça é local, ou seja, em todos os povoamentos se produz cortiça de qualidades muito diversas (figura 2.8 [Ferreira *et al.* 2000]). Tanta variação local não parece explicar-se apenas por factores ambientais, mas o facto de observar-se nas descendências de sobreiro uma grande heterogeneidade

fenotípica, a par da alogamia que caracteriza o género *Quercus*, leva a atribuir-se aos sobreiros, como aliás aos carvalhos em geral, uma elevada heterozigose [Subericultura p. 104] — ou seja, mesmo no cruzamento entre dois sobreiros genotipicamente superiores, podem facilmente produzir-se descendentes de má produção. A relação entre este quadro geral, em que muita da presumível variância genotípica será não-aditiva, e a variação na qualidade da cortiça em particular, é totalmente desconhecida.

Em suma, embora seja convicção generalizada que existe uma componente genética que contribui para a variação na qualidade da cortiça, a mesma ainda permanece por avaliar com ensaios de proveniência e de descendência adequados. Apenas muito recentemente houve um esforço, a nível internacional, de estabelecer esses ensaios para acompanhamento no futuro [Varela 2001, Varela *et al.* 2003b, <http://europa.eu.int/comm/research/agro/fair/en/pt0202.html>, Almeida *et al.* 2005], portanto e aparte a possibilidade de avaliar precocemente a qualidade da cortiça, não será antes de algumas décadas que talvez se conheçam os resultados. No presente contexto, importa principalmente considerar a possível implicação do hibridismo na qualidade da cortiça.

3) Cortiça preguenta e a hipótese de sua origem nos híbridos com azinheira

Vieira Natividade, utilizando uma técnica por si desenvolvida com sobreiro para a análise histológica das peridermes (isto é, dos derivados do câmbio suberofelodérmico), pela qual pôde analisar a relação entre a actividade do câmbio suberofelodérmico e a anatomia microscópica da cortiça amadia daí resultante [Natividade 1934], fez uma comparação entre o que seriam os padrões histológicos característicos da azinheira, de sobreiro e dos híbridos de sobreiro e azinheira [Natividade 1936]. Estes últimos apresentavam uma intercalação de ambos os padrões histológicos (de sobreiro e de azinheira), alternando entre si de modo variável, consoante a árvore e mesmo dependendo da zona do tronco. Mais precisamente, enquanto nos sobreiros a actividade do câmbio suberofelodérmico, produzindo peridermes contínuas, é persistente durante longo tempo — não sendo substituído senão como consequência do descortiçamento — na azinheira essa actividade é de curta duração, diferenciando-se novos núcleos de tecido gerador, limitados em extensão e englobando nos intervalos restos de líber, numa sucessão periclinal de inúmeras formações de consistência lenhosa, que constituem o ritidoma; nos híbridos, apesar da existência de peridermes contínuas como nos

sobreiros, intercalam-se entre elas regiões características da azinheira [Natividade 1936]. Deste modo se explicaria a aparência intermédia destes híbridos em termos de cobertura do tronco [Natividade 1936] (cf. fotografias no Apêndice I secção C2).

O padrão observado nos híbridos foi interpretado como análogo, embora em diferente grau, ao do que anteriormente havia sido observado em cortiça “preguenta” ou “madeirenta” [Natividade 1934, fig. 67, pp. 89–96]. Este tipo de cortiça é considerada de muito má qualidade porque é atravessada por veios lenhosos que dificultam a sua extracção e o seu processamento industrial, e as imagens publicadas no conjunto destes dois estudos denotam, na interpretação de Natividade, o mesmo fenómeno: a intercalação de tecido lenhoso (peridermes parciais, dispostas em arcos sobrepostos) que interrompem a continuidade do tecido suberoso característico da cortiça normal (camadas contínuas, paralelas ao câmbio). Para Natividade, os sobreiros de cortiça preguenta originam-se da descendência de híbridos, e por terem genes de azinheira introgrididos produzem este tipo particular de cortiça. Por outras palavras, mesmo que os híbridos sejam relativamente raros, a prevalência de genes de azinheira nos sobreiros pode ser importante, contribuindo para uma parte da cortiça de refugo.

Um sobreiro de cortiça preguenta é facilmente identificado desde as primeiras tiradas, pois o seu entrecasco se mostra muito enrugado, com projecções em relevo pontiagudas, alinhadas longitudinalmente segundo a orientação dos feixes liberinos (cf. Apêndice I secção C3). A ser verdade que estes sobreiros têm origem híbrida, seria talvez legítimo erradicá-los, o que não ofereceria dificuldades de maior visto que os tiradores os sabem reconhecer; essa erradicação não foi levada a cabo naquela época, não talvez por eventuais dúvidas sobre a hipótese avançada por Natividade, mas porque essa cortiça, apesar da sua má qualidade e da dificuldade em ser tirada, é sempre uma minoria da que se extrai e pode ser aproveitada para a indústria de aglomerados [Subericultura p. 235].

Contudo, se no futuro a percepção da cortiça preguenta mudar, não serão apenas esses sobreiros (e os híbridos) que podem tornar-se alvo de abate selectivo: as azinheiras dos montados mistos acabam por ser consideradas uma ameaça à “pureza” dos sobreiros nesses montados (conceito dúbio, como se verá), o que teria consequências muito mais graves, inclusivamente a nível ecológico. Por isso a pressão que já exista ou possa vir a desenvolver-se no sentido da eliminação das azinheiras dos montados mistos não parece corresponder a uma real necessidade de proteger a qualidade da cortiça, mas antes a uma ânsia de expandir a

cultura do sobreiro à custa da eliminação das azinheiras. A cultura do sobreiro em associações naturais, biologicamente mais equilibradas e com defesas mais eficientes (citando-se associações com o medronheiro, o carrasco e o zambujo, e implicitamente a azinheira [Subericultura p. 219], referência 9330 do Plano Sectorial da Rede Natura 2000⁹), é uma vantagem que talvez não chegue a ser anulada pelo risco de hibridismo, no caso com a azinheira, sobretudo se esse hibridismo for suficientemente raro. Sem haver uma medida para a taxa de hibridismo nos montados mistos de sobreiro e azinho, a consideração por parte de Vieira Natividade de que constituem uma associação pouco prudente (mesmo que não se aproveite a regeneração natural [Subericultura p. 219]) não é sustentável [Varela 1995].

A hipótese sobre a origem dos sobreiros de cortiça preguenta, formulada por Natividade, é totalmente concordante com a evidência por ele apresentada, mas assenta no pressuposto de que as inclusões de tecido lenhoso nessa cortiça têm uma causa diversa doutras que esse mesmo autor descreve devidas a formações de esclerênquima, em feixes liberinos de maior calibre ou sob as lentículas, que também se evidenciam por relevos característicos no entrecasco sem forçosamente estarem associados a cortiça de má qualidade [Subericultura pp. 152–3]. As comparações feitas com híbridos e azinheiras [Natividade 1936] usaram como termo de referência da espécie “pura” de sobreiro as árvores que mais fielmente reproduziam o tipo específico [Natividade 1934 p. 128], enquanto uma comparação mais sistemática da variação em sobreiros de cortiça não-preguenta, das mais diversas qualidades, especialmente se acompanhada por caracterização através de marcadores genéticos dessa qualidade, poderia permitir uma melhor avaliação sobre a distinção dos sobreiros de cortiça preguenta em relação à generalidade dos restantes. Formalmente, nunca foi determinado se a causalidade da cortiça preguenta é genética, ambiental, ou uma interacção entre ambas. Com estas lacunas de informação, não é lícito tirar conclusões sobre a hipótese de Natividade, embora se deva levar em conta os seus fortes argumentos, com que permanece muito plausível.

C — Descrições dos híbridos

Os híbridos entre sobreiro e azinheira, que na nomenclatura botânica são designados *Quercus* × *morisii* Borzi, embora seja preferível a

⁹ http://www.icn.pt/psrn2000/caracterizacao_valores_naturais/habitats/9330.pdf

designação *Q. × morisii* f. *mixta* Franco & Vasc. por implicar apenas a subespécie de azinheira *rotundifolia* [Vasconcelos & Franco 1954], são bem conhecidos das populações alentejanas, que muitas vezes lhes reconhecem o carácter híbrido. Além disso, utilizam a casca na preparação dum chá a que atribuem propriedades abortivas, como é visível pelas mutilações que a mesma apresenta em diversas árvores ([Natividade 1936]; cf. Apêndice I secção C2). É aliás pela casca que mais facilmente se identificam estas árvores no campo, quando já adultas, pois pela sua consistência não se confunde com a cortiça dos sobreiros, e pela espessura e cor não se confunde com o ritidoma da azinheira. O nome popular que se lhe atribui actualmente é carvalho cerqueiro (ou apenas cerqueiro) referido por Vieira Natividade [1936], ao que parece distinto do “negral”, nome usado pelo menos no Alto Alentejo para referir formas relativamente frequentes que são sistematicamente eliminadas pelos produtores durante as desmoitas, pela presunção de serem híbridos; estas duas designações aparecem na língua portuguesa também para *Q. pyrenaica*, e regista-se cerqueiro-bravo para *Q. lusitanica* [Franco 1990, Vasconcelos & Franco 1954]¹⁰. O presente estudo não incluiu os “negrais”.

1) Taxonomistas

Deve-se a Pereira Coutinho a primeira referência detalhada e sistematizada aos híbridos entre sobreiro e azinheira em Portugal [Coutinho 1888], para os quais registou os nomes de carvalho cerqueiro, carvalho de sequeiro e azinheira macha. Define-os como híbridos em função de critérios de aplicação geral, discutidos em detalhe nesse mesmo trabalho, incluindo o apresentarem caracteres importantes de uma ou outra das duas espécies a que se lhes atribui a origem, o aparecerem predominantemente na proximidade de ambas e, apesar de considerá-los frequentes, encontrarem-se dispersos (este último critério, a que o autor atribuía grande importância, pode talvez não aplicar-se em muitos casos de hibridismo entre *Quercus*, pelo menos nas espécies americanas [Benson *et al.* 1967, Williams *et al.* 2001, Gonzalez-Rodriguez *et al.* 2004a, b]). Acrescenta que o facto de serem férteis não é excepção dentro do género *Quercus*. Para a diagnose dos híbridos, sugere nas chaves dicotómicas, entre outros caracteres, o revestimento do tronco (que não considera suberoso), a pilosidade das anteras (glabras como na

¹⁰ O nome cerqueiro não deve confundir-se com o nome cerquinho, usado em geral para *Q. faginea* Lam. ssp. *faginea*, e localmente para *Q. lusitanica* [Vasconcelos & Franco 1954].

azinheira), o ângulo no ponto de inserção das nervuras secundárias na principal (relativamente agudo, como no sobreiro) e a disposição das escamas da cúpula (tendencialmente compridas e soltas, como no sobreiro). Num suplemento à *Flora de Portugal*, Coutinho parece basear-se no trabalho então ainda por publicar de Vieira Natividade [Natividade 1936] para considerar que o revestimento do tronco se compõe de tecido suberoso muito mais desenvolvido que na azinheira [Coutinho 1935].

Vasconcelos e Franco [1954] referenciam os cerqueiros em 14 concelhos, a maior parte em Trás-os-Montes e Alto Douro e no Alto Alentejo, mas abrangendo também o Baixo Alentejo, Olhão e mesmo Loures. A diagnose é feita através das folhas, afins às do sobreiro pelo ângulo de inserção das nervuras secundárias, e pela nitidez dessas nervuras na página superior (mas que no tipo juvenil se aproximam da azinheira pelo recorte espinhoso-dentado das folhas e pelo ângulo de inserção das nervuras secundárias na principal, menos agudo, e no tipo adulto pelos pecíolos mais curtos); e pelo tronco, onde consideram não haver revestimento suberoso mas ritidoma. Os nomes vernáculos cerqueiro e azinheira macha são listados para este híbrido.

Dispondo das descrições para os esquemas da *Flora Europæa* e de Krüssmann (figura 2.1), podem acrescentar-se caracteres diagnosticantes *a priori* entre o sobreiro e a azinheira (tabela 2.2), a maior parte deles associados às flores e frutos.

Alguns destes caracteres (perianto feminino e estiletes, maturação dos frutos) não se verificam claramente, mesmo no sobreiro e na azinheira, nas descrições de Vasconcelos e Franco [1954]. Nestas confirma-se que os híbridos têm folhas juvenis semelhantes às de azinheira (espinhoso-dentadas), anteras pubescentes como o sobreiro (em contradição a Coutinho [1888]); acrescente-se a floração em Abril, isto é, entre a da azinheira (Março-Abril) e a do sobreiro (Maio), os gomos pubescentes como em sobreiro, e ráquis dos amentilhos hirsutos como na azinheira.

2) Vieira Natividade

No estudo sobre as peridermes dos híbridos [Natividade 1936] incluem-se observações sobre outros aspectos destas árvores, donde se destacam a referência a trabalhos que reiteradamente registam a sua presença na Andaluzia, uma análise detalhada da consistência das folhas, e a expressão fenotípica nas suas descendências.

Quanto às folhas, Vieira Natividade confirmou a aparência predominantemente de sobreiro (forma, recorte, nervação lateral), bem como a cor do tomento na página inferior semelhante à de azinheira, já

indicada por Coutinho [1888] e mais tarde reiterada por Vasconcelos e Franco [1954], mas sobre este carácter aparentemente constante definiu-o como difícil de apreciar com rigor (o mesmo considerou sobre o brilho da folha na página superior, semelhante ao da azinheira). Junta-lhes a consistência coriácea das folhas na fase adulta, associada a uma espessura semelhante à de azinheira (superior à do sobreiro), resultante das camadas hipodérmicas, praticamente inexistentes em sobreiro, e da espessura das paredes celulares em contacto com a cutícula.

Quanto ao revestimento do tronco, apresenta-se nas árvores mais desenvolvidas¹¹ «uma grande analogia com o sobreiro pelo enguiado, a cor, a espessura e a consistência predominantemente suberosa» [Natividade 1936]. Ainda assim, e também pela arquitectura anatómica que descreveu (cf. secção B3), o fenótipo destas árvores era intermédio entre as duas espécies progenitoras.

Tabela 2.2 — Critérios diagnosticantes entre sobreiro e azinheira em função dos esquemas taxonómicos delineados na figura 2.1 [Tutin 1964, Franco 1990, Krüssmann 1978].

Flora Europæa		Esquema de Krüssmann	
Subgénero <i>Cerris</i>	Subg. <i>Sclerophyllodrys</i>	Secção <i>Suber</i>	Secção <i>Ilex</i>
1. Folhas persistentes ou caducas, denticuladas a penatífideas	1. Folhas persistentes coriáceas, na fase juvenil frequentemente dentadas ou asserado-espinhosas	1. Estilete linear, bastante pontiagudo, direito ou deflexo	1. Estilete curto, arredondado
2. Anteras geralmente obtusas, pilosas	2. Anteras geralmente mucronadas, glabras ou pilosas	2. Escamas da cúpula livres ou só ligeiramente aplicadas	2. Escamas da cúpula aplicadas
3. Perianto das flores femininas pateniforme, dividido em lóbulos lineares	3. Perianto das flores femininas campanulado, lóbulos obtusos	3. Frutos amadurecem em 1 ou 2 anos	3. Frutos amadurecem em 1 ano
4. Estiletes enrolados	4. Estiletes lineares		4. Folhas espessas, coriáceas
5. Frutos de maturação bienal, mais raramente anual	5. Frutos de maturação anual ou bienal		
6. Endocarpo glabro	6. Endocarpo tomentoso		

Tratando-se de cerqueiros disseminados em povoamentos de resto “puros” de sobreiro, em Grândola e Mora, e tendo em conta a analogia com

¹¹ Na amostra que observou, descreveu estes híbridos como árvores quase sempre de pequena estatura, o que na realidade quer dizer que a maior parte eram ainda jovens.

a fertilidade dalguns sobreiros com flores masculinas estéreis observados anteriormente, as descendências destes híbridos deveriam descender em grande parte da polinização com pólen de sobreiro. No entanto, duma mesma árvore, observavam-se plantas juvenis indistintas das azinheiras nessa fase, se bem que minoritárias, algumas intermédias, e a maior parte indistinguíveis dos sobreiros. Este resultado, análogo ao que se obteve de híbridos *Q. × hispanica* e *Q. × aënsis*, serviu para atestar a origem híbrida desses cerqueiros.

Finalmente, os cerqueiros apresentavam uma intensa esclerificação dos raios medulares largos, que é característica dos sobreiros mas não das azinheiras [Natividade 1936].

3) Outras observações e sùmula

As emissões de isoprenóides pelas folhas dos *Quercus*, que derivam do Carbono recém-fixado pela fotossíntese e se julga terem um papel estabilizador das membranas face ao calor, atenuando a inibição da fotossíntese pelas altas temperaturas [Loreto *et al.* 1998, Delfine *et al.* 2000], consiste de isoprenos na generalidade do género, de monoterpenos nas azinheiras (e em *Q. coccifera*) e, ainda em sobreiro, apesar de neste (e em *Q. cerris*) se ter afirmado a ausência destas emissões [Loreto *et al.* 1998]. A emissão de monoterpenos pelos sobreiros [Staudt *et al.* 2004, Pio *et al.* 2005] retira-lhe o carácter diagnosticante em relação à azinheira e, presume-se, aos híbridos. A codominância observada nos híbridos entre azinheira e *Q. robur* (*Q. × turneri*), e entre azinheira e *Q. canariensis* (?), isto é, um padrão misto de monoterpenos e isoprenos [Schnitzler *et al.* 2004; Staudt *et al.* 2004], não pode servir para interpretar a emissão em sobreiro como um indicador de pressupostas introgressões de genótipo de azinheira [Staudt *et al.* 2004], principalmente por não excluir-se a possibilidade das variações observadas entre povoamentos serem de causa ambiental.

Ao contrário da subespécie *ilex*, a subespécie *rotundifolia* apresentou valores sempre muito próximos dos de sobreiro nos parâmetros das curvas de pressão-volume, que no contexto mais alargado de definir grupos funcionais dentro dos *Quercus* mediterrânicos permitem inferir a fisiologia do aproveitamento da água disponível; globalmente, este estudo definiu um grupo perenifólio/ esclerófilo incluindo os três táxones junto com *Q. coccifera* e *Q. chrysolepis* Liebm. [Corcuera *et al.* 2002]. Este resultado sugere que, em termos de aproveitamento da água, a fisiologia dos híbridos entre sobreiro e azinheira deverá ser semelhante à das duas espécies respectivas.

A composição das sementes em compostos fenólicos, derivados do ácido gálico [Cantos *et al.* 2003] mostra predominância de espectros do tipo ácido gálico na azinheira, e dos do tipo ácido elágico no sobreiro. Este último também se distinguiu pela abundância de dilactona de ácido valoneico no tegumento da semente. Nos híbridos não foram feitas observações.

No decurso do presente trabalho houve a oportunidade de observar diversas árvores, confirmando-se as descrições existentes e acrescentando-se alguns caracteres:

Analogamente às azinheiras, estes híbridos são muito tardios na diferenciação da cobertura do tronco. Em consequência, nem todos os híbridos observados no campo apresentam a suberificação que lhes é característica na maturidade (cf. Apêndice I secção C2), e é possível que a insistência de alguns taxonomistas em descrever a casca como coberta por ritidoma não suberoso se relacione com este desfasamento. A semelhança das folhas na fase juvenil com as da azinheira nessa mesma fase, talvez uma característica materna se considere provável a tendência para as azinheiras serem o progenitor feminino dos híbridos (cf. parte II secções C3 e D2), deve levar a confundir com as azinheiras as plantas híbridas, que só ganham caracteres de sobreiro (revestimento suberoso, folhagem, caracteres florais) à medida que se tornam adultas. Isto talvez explique porque os híbridos nem sempre são detectados nos povoamentos mistos, a tempo da desmoita. Tal como no trabalho de Natividade [1936], observaram-se plantas descendentes dos híbridos semelhantes às de azinheira como ao sobreiro.

Algumas das árvores mais maduras (ritidoma suberoso) tinham envergadura e altura não inferior ao que é usual observar nas espécies progenitoras (cf. Apêndice I secção C2).

As folhas conferem à copa a tonalidade de sobreiro, isto é, um verde não acinzentado (este carácter é mais difícil de observar na Primavera, por causa da nova folhagem e do candeio). Confirmou-se a observação de Natividade [1936] que a espessura, em corte transversal, é a das folhas de azinheira e não a das de sobreiro.

Mostrou-se impraticável utilizar na diagnose a cor do tomento na página inferior das folhas (como previu Natividade [1936]), bem como a da textura mais ou menos acetinada do interior da cúpula do fruto [Coutinho 1888, Vasconcelos & Franco 1954].

A comparação das escamas da cúpula dos frutos dos híbridos com as de azinheira ou de sobreiro não foi conclusiva, embora não pareça ser diagnosticante, face à grande variação neste carácter em sobreiro

[Coutinho 1888, Natividade 1950, Vasconcelos & Franco 1954, Franco 1990].

Confirmou-se ainda que a floração da azinheira é mais precoce que a do sobreiro, em média de 4 a 6 semanas [Varela 1995, Brás 1999, Varela et al., em preparação], e com base em observações no ano de 2003 os híbridos distribuem-se no período intermédio entre as duas espécies (cf. Apêndice II secção E1).

Os grãos de pólen dos híbridos (cf. Apêndice II secção E2) têm dimensões bastante próximas das dos provenientes de azinheira, embora se tivesse notado uma maior dispersão de valores; outra observação de interesse foi a taxa elevada de grãos de pólen “incompletos”, geralmente reduzidos à exina, o que parece ser um indicador de abortamento, característico dos híbridos de *Quercus* [Rushton 1993].

Reunindo a informação aqui incluída, deduz-se um quadro da expressão nos híbridos dos caracteres morfológicos e fenológicos das espécies progenitoras (tabela 2.3).

Tabela 2.3 — Expressão de alguns caracteres discriminantes entre sobreiro e azinheira nos híbridos *Quercus* × *morisii* f. *mixta*. Para cada órgão, separam-se os caracteres semelhantes à azinheira, ao sobreiro, ou intermédios. As chamadas numeradas referem as fontes bibliográficas citadas em rodapé.

Órgão	Expressão nos híbridos
Tronco	azinheira: desenvolvimento tardio do ritidoma intermédio: suber atípico no adulto ¹ sobreiro: intensa esclerificação dos canais medulares largos ¹
Folhas	azinheira: fase juvenil de recorte espinhoso-dentado ² ; ângulo de inserção das nervuras secundárias ^{2,3} ; comprimento do pecíolo ² e espessura do limbo ¹ na fase adulta; cor do tomento na página inferior ^{1,2,3} sobreiro: gomos pubescentes ² , folhas do adulto de recorte denticulado ² , nervuras secundárias visíveis na página superior e inseridas em ângulo agudo ^{1,2,3} , cor da copa
Floração masculina	azinheira: ráquis dos amentilhos hirsutos ² , dimensão média dos grãos de pólen intermédio: época de floração ² sobreiro: anteras pubescentes ²
Frutos	intermédio: textura do interior da cúpula ^{2,3} sobreiro: escamas da cúpula ^{2,3}

¹ [Natividade 1936] ² [Vasconcelos & Franco 1954] ³ [Coutinho 1888]

D — Abordagem genética

1) Isoenzimas

Dois estudos de Ellena-Rossellò *et al.* [1992, 1997] sugeriram que algumas das variantes isoenzimáticas observadas em sobreiro e azinheira

eram discriminantes entre as duas espécies, e com base nesse pressuposto deduziram que existe hibridismo nas populações estudadas.

O primeiro estudo [Ellena-Rossellò *et al.* 1992], citado frequentemente, relata a ocorrência de 1 híbrido entre 35 indivíduos jovens, num povoamento misto em Cáceres maioritariamente com azinheiras; mas o critério de discriminação baseou-se em apenas 50 azinheiras e 41 sobreiros que serviram de “padrão”, enquanto as amostragens muito mais extensas de Michaud *et al.* [1995] em azinheira e de Toumi & Lumaret [1998] em sobreiro vieram a comprovar que os alelos considerados “discriminantes” nos *loci* *Lap1* e *Acph1* não o eram de todo; e no estudo de 1997, o “alelo” 2 em *Est1* ocorria em ambas as espécies, assim invalidando a conclusão inicial. Na melhor das hipóteses, o único caso possivelmente envolvendo hibridismo nestes estudos é uma azinheira adulta com o alelo 3 de sobreiro em *Est1* [Ellena-Rossellò *et al.* 1997], mas este *locus* não foi escrutinado em amostragens mais representativas (excepto num trabalho só em sobreiro, mas onde a alteração da nomenclatura dos zimogramas não permite uma comparação [Ellena-Rossellò *et al.* 1996]), de modo que, com amostragens tão reduzidas, é questionável se se pode interpretar dessa maneira este marcador. Aparentemente, os autores do primeiro estudo consideraram que cada banda presente em ambas as espécies é indício de fluxo genético interespecífico, sem chegarem a levar em conta as possibilidades de homoplasia ou de polimorfismo partilhado.

Toumi e Lumaret [1998] detectaram em sobreiros alelos minoritários que afirmam serem de azinheira. Tendo em conta definirem como alelos de sobreiro apenas os que não fossem encontrados noutras espécies (azinheira, carrasco), há lugar a perguntar como é que as amostragens de apenas algumas dezenas de indivíduos por povoamento iriam esgotar a diversidade intra-específica de sobreiro... note-se que tal definição levou a que em 7 *loci* fossem identificados 25 alelos “de azinheira ou de carrasco” introgridos em sobreiro! Em apoio à sua interpretação, os autores citam duas árvores na Catalunha com morfologia intermédia que eram heterozigóticas para alelos “discriminantes” (não especificados) em 2 *loci*, mas também ilustram a completa resolução das duas espécies num povoamento misto da Sicília, usando os genótipos em todos os *loci*, apesar de considerarem haver alelos de azinheira em alguns sobreiros (ou talvez o contrário, cf. final deste parágrafo). Apesar do critério usado parecer muito arbitrário, da utilização de diferenças interespecíficas demasiado subtis para constituírem verdadeiros marcadores

discriminantes (por exemplo *Lap1*^{.96} em azinheira e *Lap1*^{.97} em sobreiro) e da prevalência de sobreiros supostamente introgressidos ser dramaticamente elevada em alguns locais, não deixa de haver resultados que lhe parecem dar alguma plausibilidade [Michaud *et al.* 1995, Toumi & Lumaret 1998]: no *locus Pgi-1*, o alelo “ilex” mais comum em sobreiro era o maioritário em azinheira em toda a distribuição desta última, e a generalidade dos outros alelos “ilex” ocorrendo em sobreiros eram comuns em toda a distribuição da azinheira ou pelo menos ocorriam nas duas espécies nas mesmas regiões. Os autores do estudo em sobreiro não ilustraram com o mesmo detalhe outros *loci*, o que poderia não só reforçar as suas interpretações e permitir uma mais completa cartografia da postulada introgressão. Com base apenas no *locus Pgi-1*, haveria introgressão de genes de azinheira em sobreiros de Marrocos (planalto central e Bab Azhar), França (Languedoque) e Espanha (Catalunha central, Serra Morena Ocidental, Sul da Andaluzia), e de genes de sobreiro em azinheiras da Sicília.

2) DNA citoplásmico

Belahbib *et al.* [2001] recorreram a diversos marcadores de DNA citoplásmico (plastidial e mitocondrial) para descreverem 6 haplótipos em sobreiros e azinheiras de Marrocos (PCR-RFLP [Demesure *et al.* 1995, Dumolin-Lapègue *et al.* 1997b]). O haplótipo mais frequente em azinheira era o mesmo que predominava nas amostragens de sobreiros do Alto Atlas, parte do planalto central, e em Bab Azhar (Atlas Médio), formando uma mancha geográfica parapátrica em relação às restantes amostragens de sobreiro, onde normalmente este haplótipo não era detectado. Em menor escala, o haplótipo de sobreiro mais frequente observava-se em amostras de azinheira de duas áreas não-contíguas dominadas por sobreiro. A interpretação destes resultados invocou a mediação de híbridos naquilo que já tinha sido descrito para *Q. robur/Q. petraea* [Petit *et al.* 1997, Belahbib *et al.* 2001], como já discutido na parte II, secção D2.

Collada *et al.* [2002] usaram a mesma estratégia para caracterizarem amostras recolhidas na Península Ibérica de sobreiro, azinheira e carrasco, mas incluindo dois novos marcadores plastidiais (e abdicando do aparentemente redundante marcador mitocondrial [Belahbib *et al.* 2001]) que lhes permitiram diferenciar 29 haplótipos diferentes, dos quais apenas um foi classificado como “suber” por ser o mais comum em sobreiro e por causa do radical distanciamento no dendrograma do

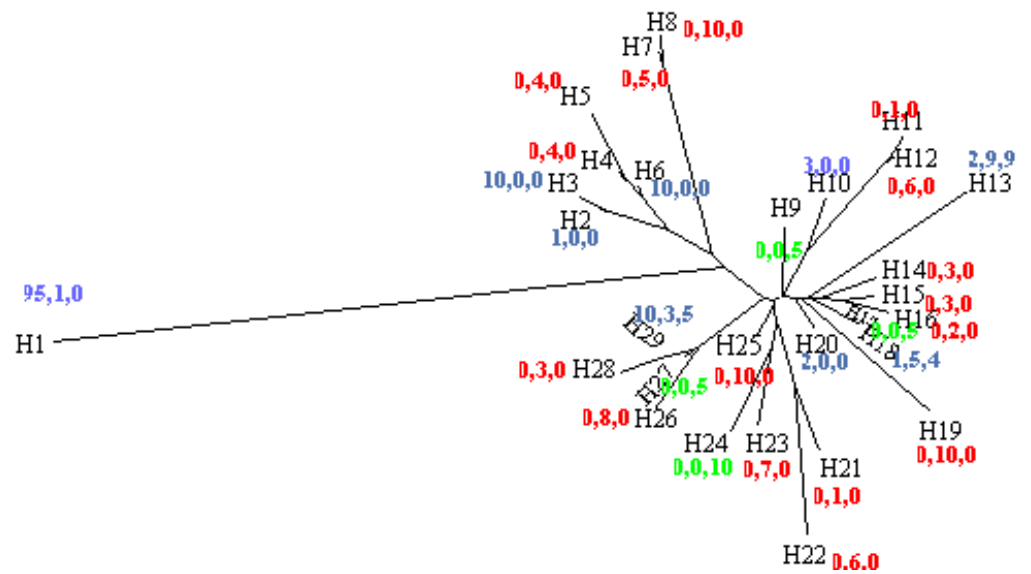
conjunto (H1 na figura 2.9a; utilizando informação detalhada posteriormente [Jiménez *et al.* 2004], seria o mesmo “suber” S1 identificado em Marrocos [Belahbib *et al.* 2001, Lumaret *et al.* 2005]). Para os restantes haplótipos, não há correspondência entre a posição no dendrograma e as espécies em que ocorrem, e a presença de alguns haplótipos em duas ou mesmo nas três espécies, assim como a sua colocalização em 3 das 14 populações (figura 2.9b), não corresponde a um padrão geográfico tão claro como em Marrocos.

Mas há uma esclarecedora correspondência entre distribuição geográfica e parentesco dos haplótipos “*ilex-coccifera*”, independentemente da espécie onde ocorrem (figura 2.9a,b): os ramos do dendrograma H26–H29 no litoral de Portugal, H2–H6 e H11–H12 na costa mediterrânica (se se considerar H2 introduzido na Andaluzia a partir dessa proveniência, o que é plausível) e H13–H20 na metade Sul de Espanha e no Alentejo.

A segregação geográfica entre ramos corresponderia a um efeito fundador antigo, talvez relacionado com o recuo das espécies na última fase glacial, e a diferenciação de haplótipos dentro de cada ramo resultaria de divergências evolutivas mais recentes, nalguns casos associadas a fixação/perda de haplótipos (por exemplo, H27 em carrasco, H26 e H28 em azinheira; mas seria fortemente desejável que o número de árvores observadas por espécie e por local fosse maior, para caracterizar os polimorfismos existentes, visto que cada haplótipo, à excepção de H1, está representado por quando muito 10 indivíduos de cada espécie).

Vista desta maneira, a variabilidade existente não implica forçosamente a invasão (pelo sobreiro) dum habitat já ocupado por uma das espécies (sobretudo a azinheira, neste caso), por hibridismo com essa espécie seguido de “submersão polínica” dos híbridos e linhagens deles descendentes [Petit *et al.* 1997, Belahbib *et al.* 2001]: é mais provável que os refúgios na última fase glacial tenham servido para uma fixação dos haplótipos percursores de diferentes ramos “*ilex-coccifera*” (H2–H29), associada a uma prolongada oportunidade de hibridação entre as 3 espécies e por isso à formação dum fundo genético comum, localmente. Apenas nos refúgios percursores das populações de sobreiro ocupando hoje a faixa Sul-Norte central se teria fixado H1 (figura 2.9b). A partilha de marcadores AFLP (nucleares) entre três espécies da secção *Stenocarpæ* levou a formular-se uma hipótese análoga [Kashani & Dodd 2002], aparentemente perfilhada pelos autores dum estudo ibérico mais recente-

a)



b)

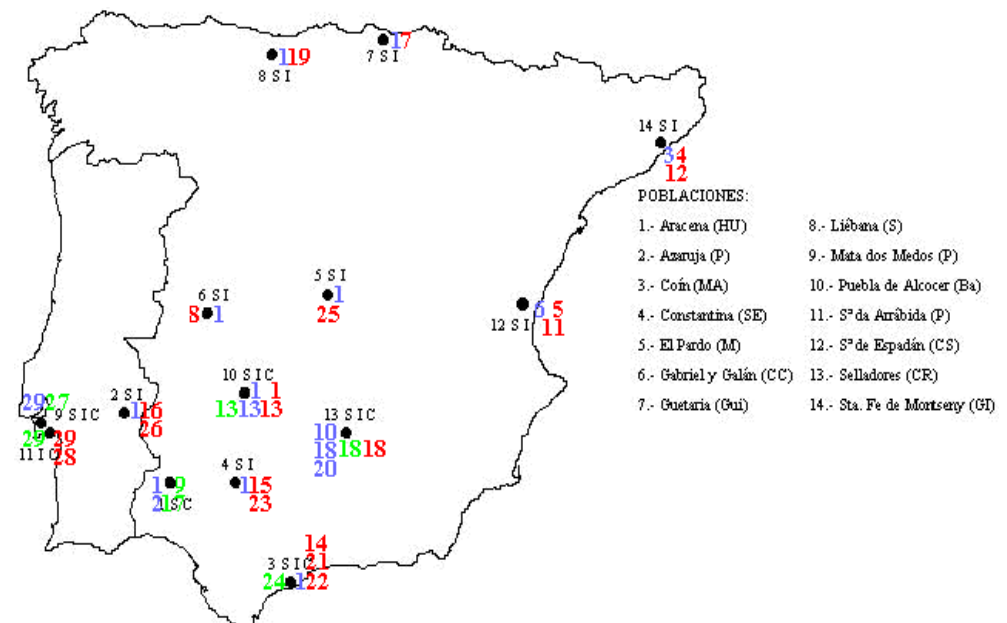


Figura 2.9 — Distribuição dos 29 haplótipos caracterizados por Collada *et al.* [2002], adaptado das figuras desse estudo. a) Dendrograma com os graus de semelhança entre haplótipos (H1–H29). Para cada um indica-se também o número de indivíduos observado de cada espécie (por ordem, *Q. suber*, *Q. ilex*, *Q. coccifera*), usando-se um código de cores para facilitar a identificação de cada espécie predominante: azul, *Q. suber*; verde, *Q. coccifera*; vermelho, *Q. ilex*. b) Distribuição geográfica dos locais de colheita, à qual foram sobrepostas as ocorrências dos haplótipos (1–29), com o mesmo código de cores a indicar cada espécie.

mente [Valbuena-Carabaña *et al.* 2005].

Jiménez *et al.* [2004], no que parece ser uma extensão do trabalho de Collada *et al.* [2002], identificaram nada menos que 81 haplótipos diferentes, aparentemente formando três ramais bem diferenciados, um deles exclusivo de sobreiro (“suber”), outro partilhado entre azinheira e carrasco (“*ilex-coccifera* II”), e outro representado nas 3 espécies (“*ilex-coccifera* I”, o mais diversificado). Do ponto de vista do sobreiro, 72% dos indivíduos eram portadores de um de 4 haplótipos “suber”, sendo os restantes representantes de 23 haplótipos “*ilex-coccifera*”, 16% com um haplótipo presente nas 3 espécies, 7% com um partilhado só com azinheira, 0,35% com um partilhado só com carrasco, e 4,42% aparentemente exclusivos de sobreiro, apesar de serem “*ilex-coccifera* I”. Espera-se que a informação sobre a distribuição geográfica de tão complexa variabilidade seja publicada, para verificar se a hipótese acima proposta para os dados de Collada *et al.* [2002] se mantém plausível.

A amostragem de sobreiros em toda a extensão de distribuição do sobreiro veio revelar padrões de distribuição filogeográfica bastante concordantes [Lumaret *et al.* 2005]. Sem abdicarem da abordagem PCR-RFLP mas baseando o trabalho em RFLP do DNA plastidial, identificaram só com esta técnica 8 haplótipos “suber”, apesar da amostragem ser muito menor (daí que talvez só 6 haplótipos “*ilex-coccifera*” fossem detectados). Neste trabalho é notável a coincidência entre o parentesco de 7 desses haplótipos e a sua distribuição geográfica diferenciada no sentido Leste-Oeste, com o ramal S1-S2 do dendrograma abrangendo proveniências de Itália e Sicília (também Córsega e Sardenha), o ramal S3-S4-S7 abrangendo Argélia e Tunísia, Sardenha e Córsega, e Provença, e o ramal S5-S6 abrangendo a Aquitânia, quase toda a Península Ibérica e Marrocos (S5 é provavelmente o que coincide com o “suber” predominante em Marrocos e na Península Ibérica [Belahbib *et al.* 2001, Jiménez *et al.* 2004], e seria altamente desejável que houvesse um esforço de uniformização das nomenclaturas). O ramal itálico, por sua vez, é fortemente aparentado com um existente em *Q. cerris*, o que é evidência eloquente da preponderância da partilha de refúgios glaciares na fixação de haplótipos comuns, muito mais credível do que a interpretação dos autores deste estudo, segundo a qual o sobreiro teria origem na Itália [Lumaret *et al.* 2005]. Finalmente, confirma-se a ausência de haplótipos “suber” nos sobreiros da costa oriental da Península Ibérica (figura 2.9) e na Catalunha francesa.

A introgressão de azinheira em sobreiro (e, em menor escala, no

sentido inverso), com base nos estudos de DNA citoplásmico citados, parece incontestável. Pelas analogias com outros *Quercus* (cf. parte II secção D2) constituiria apenas mais um exemplo do que provavelmente é uma característica do género, não fossem dois aspectos que o colocam à parte: as contradições que tem com a classificação destas duas espécies em subgéneros diferentes, feita pela *Flora Europæa* [Tutin 1964], que como se viu na parte I é um esquema taxonómico filogeneticamente incorrecto mas reiteradamente faz perceber este caso de hibridismo como uma pretensa anomalia [Toumi & Lumaret 1998, Belahbib *et al.* 2001, Collada *et al.* 2002, Jiménez *et al.* 2004]; e as implicações de gestão e ordenamento, nomeadamente quanto ao futuro da azinheira no que hoje são grandes extensões de montado misto em Portugal.

3) DNA nuclear

Até agora conhece-se apenas a exploração preliminar de marcadores de nSSRs dinucleotídicas (GA)_n [Soto *et al.* 2003], usando sequências conservadas entre *Quercus* como alvos dos *primers* (tabela 2.4). A análise de amostras de folhas dos descendentes obtidos por polinização controlada confirmou a codominância dos marcadores utilizados. Com uma amostragem por *locus* de apenas 18 cromossomas de sobreiro e 22 de azinheira, seria temerário dizer que qualquer um dos 6 *loci* propostos já estão validados como ferramentas de diagnóstico de hibridismo: o elevado polimorfismo dos fragmentos amplificados, que leva a considerar a hipótese de serem encontrados em amostragens maiores outros alelos eventualmente não-discriminantes, e o reduzido distanciamento entre “alelos” presumivelmente discriminantes (por causa das “bandas-fantasma” distanciadas da “real” de 1 par nucleotídico ou até mais [Hornero *et al.* 2001]) faz com que, apesar de promissora, esta abordagem ainda deva requerer mais *loci* para a detecção em larga escala de híbridos e principalmente introgressões. Este estudo merece atenção também pelo facto de introduzir nas duas espécies uma série de marcadores altamente polimórficos, de modo a permitir estudar a sua biologia de reprodução da mesma maneira que foi feito noutras espécies (cf. parte II secção D1).

Como já discutido na parte II, secção D2, os híbridos de sobreiro e azinheira são os que melhor se prestaram até agora à análise genética, pela existência de marcadores monomórficos discriminantes e codominantes, podendo assim já contar-se com uma bateria de vários *loci* isoenzimáticos [Oliveira *et al.* 2003 e presente trabalho], a região central

dos *loci* rDNA [Bellarosa *et al.* 2005] e, espera-se, um ou mais marcadores nSSR [Soto *et al.* 2003].

Tabela 2.4 — Resumo dos polimorfismos de nSSRs de sobreiro e azinheira em 6 *loci* propostos por Soto *et al.* [2003] para uso na discriminação interspecífica entre sobreiro, azinheira, e seus híbridos.

Quercus suber (N = 9) / *Quercus ilex* (N = 11)

	MSQ13	MSQ4	QpZAG9	QpZAG15	QpZAG36	QpZAG46
nº total de alelos	1/7	3/2	2/5	3/12	8/5	5/4
nº alelos discriminantes (e com diferença > 1 bp)	1/7 (1/7)	2/2 (2/1)	2/5 (1/3)	2/11 (2/11)	7/4 (5/3)	5/4 (4/3)
freq. do alelo comum	1,00/0,27	0,78/0,82	0,89/0,55	0,56/0,23	0,33/0,46	0,44/0,50
diag. interespecífico ^a	+	–	–	–	–	–
diag. intra-específico ^b	– / +	+	± / +	+	+	+

^a poucos alelos, todos discriminantes e com uma diferença entre espécies acima de 1 par nucleotídico (bp), é favorável à detecção de híbridos e introgressões (+)

^b um elevado número de alelos, especialmente se o mais comum tiver frequência baixa, torna o *locus* propício para análise parental (+)

Parte IV: Separação de isoenzimas por electroforese

A — Perspectiva histórica da metodologia

A análise de isoenzimas por electroforese e a sua aplicação na Genética surgiu da confluência de diversas disciplinas (bioquímicas, genéticas e citológicas). Em 1955 descobriu-se que o amido hidrolisado podia servir como matriz de separação electroforética, para a análise de várias amostras em simultâneo [Smithies 1955], não tardando a ser considerada a técnica preferencial para a análise de variações hereditárias a nível molecular, nomeadamente as das hemoglobinas [Lewontin 1982], desde muito cedo o veículo para avanços significativos no estabelecimento dum nexos lógico entre uma variação fenotípica e o seu carácter genético, expresso ao nível proteico e nas suas consequências metabólicas [Pauling *et al.* 1949, Ingram 1957].

O conceito de isoenzima (também referido como isozima) surgiu pela mesma altura para referenciar em termos gerais qualquer ocorrência de pelo menos duas variantes moleculares com a mesma actividade

enzimática num indivíduo [Acquaah 1992]¹². Embora sem terem actividade catalítica, as hemoglobinas serviram como exemplo precoce também deste conceito em diversos vertebrados, pela diversidade alélica na espécie humana, e a sucessão na ontogenia de isoformas separáveis por electroforese [Lewontin 1982, Harrison *et al.* 1988]. Em casos como este em que a expressão é distinta no tempo, ou localizada em órgãos ou compartimentos celulares distintos, verificável por técnicas de fraccionamento subcelular [Morré 1971], os genes respectivos não são alélicos, pois derivam de duplicações ocorridas no passado evolutivo da espécie e assim correspondem a *loci* cromossómicos distintos, situados na proximidade uns dos outros no mesmo cromossoma ou em grupos de ligação diferentes [Gottlieb 1982, Acquaah 1992]. Já os isoenzimas codificados por alelos dum mesmo *locus* são em geral coexpressos nas mesmas células, designando-se especificamente por aloenzimas ou alozimas [Acquaah 1992].

Se a técnica de preparação de géis de amido para electroforese estava a atingir a sua maturidade [Kristjansson 1963, Fine & Costello 1963], eram poucas as entidades moleculares disponíveis para análise genética: escasseiam as proteínas que podem ser especificamente demonstradas pela sua cor e ao mesmo tempo são abundantes, como é o caso da hemoglobina, enquanto a coloração de todas as proteínas num gel pode revelar muita variação, nem sempre identificável geneticamente por uma análise mendeliana detalhada, e ainda assim restrita às mais abundantes.

A aplicação das técnicas citológicas de revelação enzimática, a amostras submetidas a electroforese, foi o ponto de viragem na análise genética a nível molecular, por trazer para este campo um grande número de marcadores genéticos [Fine & Costello 1963, Scandalios 1964]. A localização microscópica de actividades enzimáticas *in situ* baseia-se no aproveitamento da especificidade catalítica de cada uma para destacar a sua presença nas estruturas biológicas [Pearse 1968]. Utilizando substratos adequados (os naturais ou seus análogos), a formação dos respectivos produtos resulta directa ou indirectamente na formação dum precipitado corado (ou fluorescente) na vizinhança da actividade enzimática que se pretende localizar. Por electroforese, seguida da incubação do gel num meio de reacção com um substrato específico, revelam-se as diversas localizações desses isoenzimas pela visualização

¹² Outras definições, como por exemplo a de Johnson [1979], não são actualmente as que se aceitam.

dos precipitados formados pelo produto da reacção ou seu derivado.

Em 1964, quando foi publicado o primeiro estudo usando a metodologia de separação de isoenzimas com fins de análise genética, o número de actividades enzimáticas para as quais existiam protocolos de revelação histoquímica era ainda relativamente limitado [Davenport 1960, Pearse 1968], mas não deixava de abrir uma perspectiva de aumentar em muito o número de *loci* disponíveis para análise. Esse primeiro estudo fez a demonstração, em géis de amido após electroforese, de variações na distribuição da actividade de fosfoglucomutase (EC 5.4.2.2) entre amostras de diferentes indivíduos da espécie humana [Spencer *et al.* 1964]; identificou-as com diferentes alelos e verificou que as frequências genotípicas não se afastavam significativamente da distribuição de Hardy-Weinberg. Quase de imediato seguiram-se estudos análogos abrangendo várias actividades enzimáticas em simultâneo [Hubby & Lewontin 1966, Lewontin & Hubby 1966], tendo-se verificado que, quer em animais, plantas ou microorganismos havia um grande número de *loci* enzimáticos polimórficos, sendo cada indivíduo heterozigótico numa proporção nada irrisória dos *loci* que se estudavam [Nei 1987].

Paralelamente, a decifração do código genético [Khorana *et al.* 1966] e as primeiras sequências de proteínas [Canfield 1963], a par do conceito de colinearidade entre estas e as dos nucleótidos nos cromossomas [Crick 1958], trouxeram uma perspectiva estrutural à variação isoenzimática, a qual se deve essencialmente a substituições de aminoácidos com implicações no ponto isoeléctrico, por sua vez resultando de mutações no material hereditário [Acquaah 1992]. Em consequência, a dinâmica da variação evidenciada na análise de isoenzimas por electroforese passava a entender-se dentro da perspectiva da dinâmica evolutiva das populações, fazendo desta metodologia o centro das atenções da Biologia Evolutiva durante alguns anos [Lewontin 1973, Nei 1987]. Com o progressivo aumento da utilização dos métodos de análise das sequências do DNA é que a análise isoenzimática perdeu esse protagonismo, porém retendo alguns nichos de utilização preferencial [May 1991].

B — Aplicação genética do método

1) Consequências para a Genética de Populações e a Biologia Evolutiva

O frequente polimorfismo nos *loci* isoenzimáticos observado por

análise isoenzimática abriu um campo vasto de aferição dos pressupostos da teoria genética das populações. E se trouxe a possibilidade de estudar cada população com respeito a um número elevado de *loci* em simultâneo, permitindo através das estatísticas da teoria genética descrever e interpretar aspectos da sua subdivisão, do fluxo de genes, de modelos de reprodução, da existência de selecção, etc., por outro também deu origem a uma importante polémica sobre a interpretação desses polimorfismos — o debate entre “seleccionismo” e “neutralismo” [Roughgarden 1979]. A teoria neutral da variação molecular [Kimura 1983, Nei 1987] lançou esse debate ao reviver e actualizar diversas fontes teóricas, nomeadamente a chamada “escola clássica” de Müller sobre as mutações [Dobzhansky *et al.* 1977, Kimura 1983, 1991], o modelo de Fisher da tolerância às mutações em função do *fitness* [Fisher 1958, Kimura 1983] e o chamado “dilema de Haldane” sobre os custos demográficos da substituição de um alelo por outro mais favorável [Dobzhansky *et al.* 1977, Kimura 1983]. Com base no efeito combinado do aparecimento de novos alelos (por mutação) e da fixação de variantes (por deriva genética), no decurso de tempos evolutivos suficientemente longos e sem a intervenção de processos selectivos, essa teoria explicava a variação na estrutura primária das proteínas entre diferentes táxones, assim como o polimorfismo nos *loci* isoenzimáticos, postulando que uma grande parte dos alelos fixados numa população resultaram de mutações selectivamente neutrais, enquanto a nível molecular a acção da selecção natural, aparte a depuração de mutantes deletérios [Kimura 1983, 1991], só episodicamente envolve novos alelos favoráveis. Por outras palavras, o valor selectivo da variação a nível molecular que se observa nas populações — ou entre populações dentro duma espécie — é *em princípio* neutro, não excluindo que haja exemplos de ser mantida por mecanismos selectivos, mas definindo-os como *excepções*.

Tais propostas vieram pôr em causa muito do arrazoado neodarwinista sobre adaptação [Lewontin 1985]. Independentemente de aceitar-se ou não a chamada teoria neutral da variação a nível molecular, justifica-se a importância que adquiriu na Biologia pelo rigor matemático com que permite analisar os polimorfismos nas mais diversas situações, e formular hipóteses nulas para a realização de testes estatísticos à variação molecular [Kimura 1983, Fuerst *et al.* 1977; Chakraborty *et al.* 1978, 1980, Nei 1987]. Contudo, a noção de que *a maior parte* dos polimorfismos enzimáticos é neutral, a par da conveniência desse pressuposto para a aplicação de estatísticas populacionais donde se

pretendem inferir processos evolutivos, acaba por levar à convicção, hoje mais ou menos generalizada, de que *a priori* os polimorfismos isoenzimáticos são selectivamente neutrais. São contudo várias as fontes potenciais de erro que não são acauteladas nesta atitude.

Tradicionalmente, só se pode considerar que um estudo com polimorfismos enzimáticos fez uma amostragem representativa do genoma quando abarque duas ou mais dezenas de *loci*, com resultados médios comparáveis a outros estudos da mesma natureza, na mesma ou noutras espécies [Lewontin 1973, Nei 1987, DeWoody & DeWoody 2005]. Subjacente a esta exigência estão diversos factores, entre os quais avulta a heterogeneidade entre diferentes *loci*, reflexo da maior ou menor influência que a variação em cada um pode ter no *fitness* dos indivíduos (isto é, do impacto fisiológico dos alelos desfavoráveis), e que se traduz numa variável taxa de substituição por fixação [Nei 1987, Kimura 1991]. Mas essa heterogeneidade pode também implicar a possibilidade do polimorfismo envolver, numa minoria de *loci*, factores adicionais ao modelo básico mutação-deriva (por exemplo, selecção). Além disso, e aqui residirá a maior limitação prática à Teoria Neutral, especialmente quando se trate de espécies com longos intervalos entre gerações, é a das populações não se encontrarem em situação de equilíbrio entre mutação e deriva (e migração), o que torna inválidas as inferências que assumem esse equilíbrio.

Ajustamentos teóricos no discurso neodarwinista vieram responder a algumas críticas neutralistas [King 1967, Sved *et al.* 1967, Wills 1978, Johnson 1979], mas a afirmação do papel da selecção natural nos polimorfismos enzimáticos, e noutros tipos de *loci*, tem envolvido demonstrações nem sempre triviais na prática, se bem que muito instrutivas. No caso da fosfoglucoase isomerase, sabe-se que entre os diferentes alelos há importantes variações da eficiência catalítica e da estabilidade termodinâmica, que têm implicações fisiológicas diferentes em diferentes fases do desenvolvimento [Watt *et al.* 1983, Watt 1992, Liu *et al.* 1999]; e a persistência de polimorfismos da cadeia β da hemoglobina humana em zonas onde existe malária está associada a maior *fitness* dos heterozigóticos nessas zonas [Harrison *et al.* 1988]. Um exemplo muito bem estudado onde se conjugam diversos argumentos de ordem genética, fisiológica e evolutiva para atribuir a vantagem dos heterozigóticos como factor determinante do elevado polimorfismo é o do conjunto de *loci*, localizados na região MHC do genoma humano, envolvidos na apresentação de antigénios aos receptores dos linfócitos T:

o estudo do genoma humano sequenciado identificou esta região como a única onde existe um excesso de variabilidade em relação ao que seria previsível pela Teoria Neutral [International SNP Map Working Group 2001] — um exemplo análogo em plantas é o de *loci* envolvidos na autoincompatibilidade [Charlesworth 1995, Uyenoyama *et al.* 2001].

A categorização dos polimorfismos enzimáticos, segundo o tipo de metabolismo onde intervêm em diversas espécies animais, revelou padrões que parecem longe de ser fortuitos [Johnson 1974]: *i*) as actividades enzimáticas que utilizam eficientemente diversas moléculas como substrato de reacção, isto é, que têm um largo espectro de especificidade (caso de várias hidrolases), *ii*) os de especificidade estrita mas com função reguladora do metabolismo, seja do fluxo através da respectiva via metabólica, seja do funcionamento de várias vias metabólicas através das concentrações disponíveis de NAD(P)H ou ATP (fosfoglucomutase, fosfoglucose isomerase, glucose 6-fosfato desidrogenase, adenilato quinase, enzima málico, etc.), e *iii*) os de especificidade estrita e sem função reguladora relevante (definidos cineticamente pelo facto das respectivas reacções se encontrarem próximas do equilíbrio *in vivo*). A maior parte do polimorfismo encontrava-se nas duas primeiras categorias, tendo sido argumentado por Johnson que isso se explica pela vantagem selectiva de haver formas alélicas que alarguem o espectro de substratos originários do ambiente externo que são metabolizados eficientemente (categoria *i*), ou que aumentem a eficiência do metabolismo face a variações ambientais (nomeadamente em populações que abrangem clines de temperatura ou doutros factores, categoria *ii*). A generalizar-se esta categorização, pode não ser possível comparar os resultados de estudos que fizeram a amostragem de diferentes conjuntos de *loci* enzimáticos, até na mesma espécie; mas não parece que a ideia tenha sido retomada, sequer pelo seu próprio autor (contudo, ver as conclusões de Zanetto *et al.* [1993], que são analisadas na secção 2, “Alguns exemplos em *Quercus*”).

Foi ainda Johnson que, a propósito da interpretação de polimorfismos enzimáticos em plantas, apontou a necessidade de avaliar quaisquer modelos de selecção na perspectiva do que designou por fenótipos metabólicos, destacando entre outros o fluxo energético pela glicólise e pela gluconeogénese, a adaptação à anaerobiose nas raízes sujeitas a alagamento, ou o ciclo de Calvin da fotossíntese [Johnson 1979]. Por seu lado, Hamrick [1979] analisou exemplos de plantas onde se notam variações das frequências de certos alelos em áreas relativamente

próximas, associados ou não a variáveis ambientais, mas quase sempre com excesso de heterozigóticos em relação aos valores da distribuição de Hardy-Weinberg, o que pode sugerir selecção favorável a esses genótipos.

Apesar de tudo, a análise crítica dos resultados com isoenzimas (e com proteínas não-enzimáticas, analisadas também por electroforese) num grande conjunto de populações animais mostrou persuasivamente a quase suficiência do modelo mutação-deriva como moldura teórica [Fuerst *et al.* 1977; Chakraborty *et al.* 1978, 1980]. Adicionalmente, também permitiu afirmar que a variação isoenzimática resulta provavelmente do acumular duma colecção potencialmente infinita de variantes mutacionais independentes (*infinite-allele*), e não por variações sucessivas (*stepwise mutation*), mas com diferentes taxas de mutação entre diferentes *loci* [Chakraborty *et al.* 1980]. Apesar da força dos argumentos estatísticos, há sempre excepções, nem sempre atribuíveis a erros estocásticos, e permanece sempre a possibilidade das forças selectivas actuando num *locus* passarem despercebidas por diluição num conjunto de dados predominantemente neutral, o que aliás, pela sua heterogeneidade, pode explicar a incompatibilidade dos modelos de vantagem selectiva dos heterozigóticos, ou da persistência de alelos ligeiramente desfavoráveis (*slightly deleterious*), com as distribuições de conjunto. No entanto, em nenhum caso se vai além de afirmar que a maior parte dos polimorfismos são neutrais, não que o sejam na totalidade. Por outro lado, mesmo que por hipótese todos o sejam, constituem apenas uma pequena amostragem do genoma e por isso as estimativas de heterozigose que são feitas a partir da sua análise dão valores pouco correlacionados com o valor real [DeWoody & DeWoody 2005].

Assim, em rigor há que assumir a tarefa de demonstrar se, nas populações duma espécie, o polimorfismo num determinado *locus* se deve a pressões selectivas desfavoráveis à fixação de qualquer dos alelos existentes, seja por vantagem dos heterozigóticos, por selecção dependente das frequências alélicas ou pela chamada selecção diversificante [Dobzhansky *et al.* 1977, Liu *et al.* 1999]. É nesse sentido que vai a recomendação de aplicarem-se as abordagens da chamada “genética demográfica”, nomeadamente pelo acompanhamento das frequências alélicas e genotípicas ao longo do ciclo de vida [Clegg *et al.* 1978, Hamrick 1982, Mitton 1993].

2) Estatísticas populacionais

Polimorfismo

Das várias estatísticas usadas para descrever os polimorfismos nas populações, destacam-se a percentagem de *loci* polimórficos na população (P) e a probabilidade esperada de *loci* heterozigóticos em cada indivíduo, que se representa com a média entre os diferentes *loci*, monomórficos incluídos, das frequências de heterozigóticos esperadas H_e (isto é, da distribuição de Hardy-Weinberg), e o número efectivo de alelos por *locus* (A_e , igual ao inverso da frequência de homozigóticos esperada, $1-H_e$). Uma fórmula de H_e é [Hamrick 1979]

$$H_e = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{k_i} p_{ij} (1 - p_{ij})$$

(p_{ij} é a frequência do alelo j do *locus* i com k_i alelos¹³)

Na literatura proveniente da Alemanha é utilizado normalmente um sistema alternativo de parâmetros (e designações próprias) desenvolvido por Gregorius e colaboradores [Hattemer 1991], incluindo a diversidade do fundo genético v (algebricamente idêntica a A_e para cada *locus*; entre *loci*, usa-se a média harmónica, ou então a diversidade gamética hipotética $V = \Pi v_i$) e a diferenciação populacional total δ_T (quase idêntica a H_e para cada *locus*, usando-se a média aritmética entre *loci*).

As plantas de semente apresentam a maior diversidade de valores estatísticos, atribuível pelo menos em parte às diferenças entre sistemas reprodutores. Há uma tendência geral de aumento da P com os valores de H_e (como esperado), em associação com algumas características, em especial a fecundidade e o modo de polinização, com as quais se correlacionaram significativamente outras características da reprodução, designadamente as preferências de cruzamento, tempo de geração e mecanismo de dispersão das sementes, assim como o estágio de sucessão ecológica, expansão geográfica e habitat, e o número diplóide de cromossomas ([Hamrick *et al.* 1979], tabela 2.5).

O género *Quercus* coincide totalmente com as tendências para alto H_e , mas a análise isoenzimática não tende a confirmá-lo, pelo menos em comparação com os valores das coníferas [Sork *et al.* 1993b]. Este facto pode lançar algumas dúvidas sobre a representatividade destes valores

¹³ Publicações menos recentes também designavam esta fórmula como índice polimórfico PI, mas esse termo aplicava-se não só a frequências de alelos como também de fenótipos (incluindo bandas de zimogramas), o que pode ser confuso [Marshall & Jain 1969, Hamrick 1979, Hamrick *et al.* 1979, Nóbrega 1997].

face à diversidade genética real dos *Quercus*, ou pelo menos à que se revela em caracteres fisiológicos através de ensaios de proveniência, implicando uma variabilidade adaptativa intra-específica muito importante [Kriebel 1993, Kleinschmit 1993, Sork *et al.* 1993b, Almeida *et al.* 2005].

Tabela 2.5 — Resumo das características estudadas por Hamrick *et al.* [1979] em relação às tendências de H_e em plantas. Considera-se alto ou baixo H_e quando este, para o estado de carácter em causa, se situa 2 vezes o erro-padrão acima ou abaixo do valor médio global (0,135). Entre os caracteres ausentes desta lista, refira-se o mecanismo de dispersão das sementes (H_e decrescente de aladas/plumosas, grandes, ingeridas, pequenas, até aderentes aos animais) e o modo de reprodução (sexuada vs. assexuada, sem qualquer correlação com os valores de H_e).

Tendências	Alto H_e ($> 0,135$)	Baixo H_e ($< 0,135$)
Estados de carácter	Fecundidade alta ($> 10^4$ /geração)	Fecundidade média-baixa (10^2 – 10^3 /geração)
	Polinização pelo vento	Autopolinização
	Predominância de cruzamentos ou modo misto (cruzamentos e autocruzamentos)	Preferência pelo autocruzamento
	Plantas perenes de geração longa	Plantas bienais
	Estádio sucessional tardio	
	$2n > 30$ cromossomas	
		Endémicas Xéricas

Coeficientes de fixação, e divergência e fluxo genéticos dentro das populações

Os factores determinantes do polimorfismo selectivamente neutral são em primeiro lugar a mutação e o tamanho efectivo N_e , tais que o valor de equilíbrio do coeficiente de fixação é $F = 1/(1+4N_e u)$, [Nei 1987], onde u designa a taxa de mutação para a unidade genética em causa, seja ela *locus*, codão, nucleótido, etc.. A acção permanente da mutação não permite a fixação absoluta ($F = 1$), e o mais provável será resultar polimorfismo sem implicar pressão selectiva se o valor de N_e ou o de u (ou de ambos) for bastante elevado — os chamados micro-satélites ou sequências simples repetidas (SSRs) constituem um exemplo de taxa de mutação elevada [Chakraborty *et al.* 1997], mas os *loci* enzimáticos não [Nei 1987]. O estudo das distribuições das frequências alélicas e do número de alelos por *locus* enzimático ajusta-se satisfatoriamente ao modelo neutral (mutação-deriva) [Chakraborty *et al.* 1980], excepto em casos onde há um excedente de alelos raros (usando para critério de raridade uma frequência inferior a 5%), que se presume representarem situações de não-equilíbrio na sequência de *bottlenecks* evolutivos.

Pela fixação, um valor limitado de N_e implica divergência em relação a outras populações da mesma espécie, que pode ser mais ou menos atenuada pelo fluxo genético entre elas. O mesmo processo pode até dar-

se dentro duma população — ou seja, a subdivisão das populações em unidades panmícticas, entre as quais o fluxo genético é mais ou menos limitado — acarretando uma diversificação interna (estratificação) suficiente para manter polimorfismos. Por outro lado, a heterogeneidade das distribuições subpopulacionais de frequências, gerada pela deriva genética, traduz-se num decréscimo da frequência de heterozigóticos observados ao nível da população (H_o) em relação ao previsto pela distribuição de Hardy-Weinberg (H_e), o chamado efeito de Wahlund [Wright 1969]. Este decréscimo é expresso em termos de coeficiente de fixação pela fórmula $F = 1 - H_o/H_e$ [Wright 1969, Berg & Hamrick 1997] e, para um alelo de frequência p no conjunto da população, é igual ao dobro da variância da respectiva frequência p' (na geração anterior) entre as diferentes subpopulações [Wright 1969]: $H_o = 2p(1 - p) - 2(\sigma_p)^2$, donde $F = (\sigma_p)^2/[p(1 - p)]$; assim, F é igual a 1 quando a variância atinge o seu valor teórico máximo, isto é, quando em todas as subpopulações esse alelo está fixado ou se perdeu.

Como as subpopulações têm N_e limitados, mesmo que funcionalmente sejam panmícticas, têm coeficientes de fixação próprios; neste quadro, Wright propôs que se considere um coeficiente de fixação para a população no seu todo (F_{IT}), e outro para as subpopulações (F_{IS}) [Wright 1969, Nei 1987]; F_{IS} assume-se idêntico entre subpopulações e tenderá a ser maior que 0 porque os valores de N_e nas subpopulações são limitados, mas ainda assim $F_{IT} > F_{IS}$ pelo efeito de Wahlund, e para expressar este efeito de diversificação populacional usa-se a estatística $F_{ST} = (F_{IT} - F_{IS})/(1 - F_{IS})$. Embora na formulação original se obtivesse uma estimativa de F_{ST} para cada alelo (cf. p. ex. Chakraborty *et al.* [1977]), a reformulação dos cálculos de F_{IT} e F_{IS} em função de frequências observadas e esperadas de heterozigóticos permite obter valores por *locus* [Nei 1987]. Além disso, a reter-se o conceito mais lato das estatísticas F , não só como coeficientes de fixação mas como medidas de correlação entre gâmetas [Wright 1965], F_{ST} representa *a priori* uma medida da diferenciação genética entre subpopulações que pode ou não ser neutral [Nei 1987]. F_{ST} também pode ser calculado segundo uma perspectiva de análise de variância, como a proporção da variância total nas frequências que é atribuível às subdivisões [Weir & Cockerham 1984].

Como o processo de fixação de genes é independente entre diferentes subpopulações, a transmissão de gâmetas entre elas tende a homogenizá-las, com o aparecimento de heterozigóticos nos *loci* onde se acumularam divergências. Wright demonstrou, para o chamado modelo das ilhas (um

número bastante grande de subpopulações de dimensão N_e constante e com uma taxa de migração m comum a todos os fluxos genéticos por migração [Nei 1997, Sork *et al.* 1999]), que $F_{ST} = 1/(1 + 4N_e m)$ [Wright 1965, Nei 1987, Berg & Hamrick 1997]¹⁴. O valor de $N_e m$ quantifica por isso o grau de homogeneização entre as subpopulações em situações de equilíbrio entre migração e deriva e, complementado por outras estatísticas, permite avaliar a que ponto a migração pode contribuir para o polimorfismo na população, assumindo-se algo arbitrariamente que é suficiente para tal quando superior a 1 [Mills & Allendorf 1996]. Mas esta relação entre $N_e m$ e F_{ST} refere-se apenas ao modelo das ilhas e assumindo neutralidade selectiva dos polimorfismos, o que não parece obstar ao seu uso talvez excessivo [Sork *et al.* 1999].

O coeficiente de diversidade genética G_{ST} [Nei, 1973] tem um significado análogo ao F_{ST} mas sem depender de coeficientes de fixação nem implicar um modelo “ideal” de subdivisão populacional [Nei 1997]; a heterogeneidade das frequências dos alelos em cada *locus*, entre subpopulações duas a duas, é convertida nas respectivas distâncias genéticas, donde se deduz, dos heterozigóticos esperados H_T (equivalente a H_e na nomenclatura de Nei), uma componente D_{ST} que quantifica a diversificação entre subpopulações (baseada no cálculo dos quadrados das diferenças $p_{ij} - p_{ik}$, entre as frequências de cada alelo i entre todos os pares $\{j, k\}$ de subpopulações). A proporção de H_T atribuível a D_{ST} é o valor de G_{ST} . Uma extensão deste sistema, no sentido de individualizar componentes de diferenciação entre espécies e entre regiões, foi proposto num estudo sobre *Quercus petraea* e *Q. robur* [Bodénès *et al.* 1997].

O sistema de Gregorius adopta uma medida de distância genética d_0 baseada no módulo das diferenças $p_{ij} - p_{ik}$, e uma diferenciação genética D_j , de cada população j em relação às restantes, que é o valor de d_0 quando o índice k se define para o conjunto das restantes [Hattemer 1991]. A média dos D_j (ponderada pelo tamanho de cada subpopulação) dá a diferenciação entre subpopulações δ , cujo significado será análogo a G_{ST} e F_{ST} , embora geralmente dê valores numericamente superiores [Herzog 1996, Gehle 1999].

Existe ainda uma outra abordagem genética à diferenciação entre populações, que se baseia nas frequências dos alelos só existentes numa região ou mesmo numa só subpopulação (“raros” ou “privados”), cujo desaparecimento nas restantes se postula dever-se à deriva genética não

¹⁴ Slatkin [1995] e Berg & Hamrick [1997] referem uma correcção para um número s de subpopulações limitado, multiplicando-se o termo $4N_e m$ por $[s/(s-1)]^2$.

compensada pelo fluxo migratório (evidentemente, para demonstrar-se esta situação são necessárias amostragens de grandes dimensões [Neigel 1997]). A média das frequências destes alelos “raros” $p(1)$ relaciona-se com $N_e m$ através da igualdade $\ln[p(1)] = a \cdot \ln(N_e m) + b$, sendo a e b valores dependentes da dimensão de amostragem [Slatkin 1987, Neigel 1997].

As estatísticas de diferenciação entre subpopulações são formuladas para cada *locus* e, por via disso, o aproveitamento de toda a informação disponível de vários *loci* é em geral limitado a assumir-se que toda a variação é neutral, sujeita a um único conjunto de factores (excepto as taxas de substituição), e em condições de equilíbrio, para então adoptar-se a média entre *loci*. É improvável que isso se verifique em algum caso, e por isso as interpretações associadas a essas médias multi-*locus* podem estar completamente erradas. Podem adoptar-se várias estratégias, como por exemplo para levar em conta o desequilíbrio gamético na diferenciação entre populações [Kremer *et al.* 1997], ou simplesmente para análise hierarquizada sobre factores ecológicos ou outros [Gram & Sork 2001] (cf. “Alguns exemplos em *Quercus*”, mais adiante). O desenvolvimento de novos marcadores e novas abordagens de análise [Vekemans & Hardy 2004, Smouse & Sork 2004], geralmente sem recurso a *loci* isoenzimáticos, está-se a revelar uma melhor solução (cf. parte II secção D1).

Não menos significativa é a demonstração de que as estimativas de m podem ser fortemente enviesadas se a distribuição de frequências no pólen real for diferente da estimada, ou for diferente da dos gâmetas femininos, ou se N_e for muito inferior ao número de indivíduos da população (o que acontece, nomeadamente, se o contributo dos diferentes indivíduos para a reprodução for variável) [Burczyk & Chybicki 2004].

O pressuposto de neutralidade nos polimorfismos aloenzimáticos

A relação teórica entre $N_e m$ e F_{ST} , colocada como o paradigma de base para a medição indirecta dos fluxos genéticos nas populações, pelo menos como complemento ou até em substituição de medições directas baseadas por exemplo no cálculo de dispersão de sementes, distâncias percorridas pelos polinizadores, etc. [Slatkin 1987, Sork *et al.* 1999], é especialmente controversa. Para além da duvidosa relevância das estimativas de $N_e m$, por causa da provável inaplicabilidade dos seus pressupostos nas populações reais (modelo de isolamento pela distância, equilíbrio neutral

entre mutação, deriva e migração [Wright 1965, Nei 1997]), é evidente a arbitrariedade das interpretações, quando alguma vez são propostas. Numa discussão do pseudo-parâmetro $N_e m$ obtido de F_{ST} [Slatkin 1987], cita-se um exemplo com borboletas da espécie *Euphydryas editha*, onde os valores de F_{ST} obtidos variaram entre 0,017 e 0,291 consoante o *locus*. Se se adoptar a “regra” de que os valores de $N_e m$ (calculados a partir de F_{ST}) inferiores a 1 indicam um fluxo genético reduzido entre as subpopulações, e face a ter havido apenas um valor de $N_e m$ nessas condições (0,6 correspondente ao F_{ST} de 0,291), comparado com sete valores $N_e m$ iguais ou superiores a 3,8, Slatkin concluiu que só o *locus* em causa (ou outro muito proximamente ligado, pelo chamado efeito *hitch-hike*) estaria implicado na adaptação local de cada subpopulação (diferentes alelos nesse *locus* eram favorecidos em diferentes subpopulações, contrariando o efeito tendencialmente homogeneizador do fluxo genético entre subpopulações). Considerando os valores de $N_e m$ nos restantes *loci* como estimativas aproximadas do “verdadeiro” valor, Slatkin adoptou o valor médio de 7,8 e passou a analisar a aparente contradição com medidas directas feitas na mesma população, que colocariam $N_e m$ de maneira convincente num valor da ordem dos 0,1; introduzindo considerandos de ordem geológica, nesta e noutras espécies, tendentes a colocar a divergência entre as subpopulações num passado muito recente, concluiu que era insuficiente para a diferenciação nos sete *loci* considerados neutrais, mas suficiente para a diferenciação adaptativa no oitavo *locus*.

Noutro caso de aparente contradição entre as estimativas directas de fluxo genético entre subpopulações e os valores $N_e m$ obtidos dos F_{ST} em *loci* enzimáticos e serológicos, respeitante à subdivisão em castas dos Dhangars (Maharashtra, União Indiana) [Chakraborty *et al.* 1977], os autores chamaram a atenção para o número de gerações desde a instituição do sistema de castas, na ordem de algumas centenas, dando a entender um processo ainda incipiente de diferenciação genética entre castas para justificarem o facto dos valores de F_{ST} serem demasiado baixos em relação à situação de equilíbrio entre migração e deriva. Mas o N_e médio de 4000 proposto por casta será discutível, não só pela presumível variação do N_e entre castas, que viola um dos pressupostos para o cálculo de F_{ST} , mas também pela duvidosa aplicabilidade desse valor no longo período de tempo em causa; se por hipótese o N_e fosse mais baixo, menos incipiente seria o processo neutral de diferenciação (o número de gerações necessário é proporcional ao N_e [Kimura 1983, Nei

1987]) mas, ao mesmo tempo, mais elevada seria a estimativa de m , tornando a sua contradição com as estimativas directas ainda maior. Também aqui persiste a dúvida sobre a suficiência da explicação neutral para os valores de F_{ST} observados.

A questão sobre as actuais populações das regiões temperadas do Hemisfério Norte não se encontrarem em equilíbrio neutral (mutação-deriva), especialmente quando se trata de espécies com tempos de geração longos, parece geralmente plausível face à recorrência de períodos glaciares e consequentes migrações e persistência em refúgios confinados, acarretando reduções drásticas dos N_e (efeito *bottleneck*). Mas este argumento, em lugar de constituir uma solução para as contradições entre estimativas directas e indirectas, como sugerido nos exemplos anteriores, seria suficiente para rejeitar as estimativas indirectas de m que se deduzem dos valores de F_{ST} .

Os exemplos em *Quercus* (cf. secção seguinte), ao deixarem implícitas taxas de migração significativas entre populações separadas de centenas de quilómetros [Ducousso *et al.* 1993, Zanetto *et al.* 1994, Michaud *et al.* 1995, Elena-Rosselló *et al.* 1996, Toumi & Lumaret 1998, Jiménez *et al.* 1999], não são consistentes com o que actualmente se conhece da biologia da reprodução neste género (cf. parte II). Acrescente-se que, contrariamente ao que tem sido repetidamente recomendado, o número de *loci* é sempre bastante pequeno, geralmente faltando a referência ao número dos que não são polimórficos, dando assim a falsa impressão que a diversidade alélica apresentada é representativa do genoma [DeWoody & DeWoody 2005]. Também é sintomática a ausência de comentários sobre a dispersão de valores de *locus* para *locus* evidente em cada estudo, quando sob o pressuposto de neutralidade selectiva deveriam constituir estimativas de um só valor para todo o genoma.

Voltando ao estudo em *Euphydryas editha*, a rejeição da hipótese “seleccionista” — que o F_{ST} baixo em vários *loci* resultaria de selecção estabilizante, convergente entre subpopulações — baseia-se no julgamento de que esses valores F_{ST} são demasiado homogéneos entre si para a diversidade de pressões selectivas e mutacionais que deveriam actuar nos diferentes *loci* [Slatkin 1987]. Mas a realidade é que os valores de F_{ST} nesse estudo não são homogéneos: em 2 dos 7 *loci* considerados neutrais em *Euphydryas editha*, os valores de $N_e m$ desviam-se da média mais do triplo do respectivo erro-padrão. O pressuposto de neutralidade selectiva implica que, como amostragem “aleatória” do genoma, deveriam ser representativos dum único valor (que a média entre eles aproximaria),

o que não parece verificar-se para os sete. Alternativamente, tem-se a perspectiva “seleccionista” de selecção estabilizante, em que quanto mais baixo o F_{ST} num *locus*, maior é o presumível efeito desse modelo de selecção (não o fluxo genético representado por $N_e m$) a contrariar a divergência entre subpopulações nesse *locus*; dos 8 *loci* polimórficos estudados em *Euphydryas editha*, apenas o de maior F_{ST} , apesar de minoritário, poderia estar mais próximo de ser neutral ($N_e m = 0,6$, enquanto pelos métodos directos seria 0,1).

O problema, para demonstrar o efeito da selecção, é que têm de evidenciar-se e mesmo quantificar-se para cada *locus* as componentes do *fitness* subjacentes aos resultados. A análise das distribuições genotípicas em 4 *loci* de esterases de *Hordeum vulgare* L. (numa metapopulação derivada de cruzamentos entre variedades representativas de todas as proveniências da espécie), em sucessivos pontos do ciclo de vida (mais precisamente, plântula-adulto-plântula), revelou oscilações das frequências no espaço de 1 geração, nalguns casos de grande magnitude [Clegg *et al.* 1978]. Estas oscilações em geral não estavam associadas a variações evolutivas (consideradas pelas diferenças após um intervalo de 10 gerações), e em diversos casos eram de grandeza muito superior a estas. Da análise concluiu-se que havia diferenças importantes de viabilidade e de fertilidade entre genótipos, embora não forçosamente associadas a estes, nem a *loci* a eles ligados proximamente: citando os autores, «o que é medido através dos *loci* marcadores é o fluxo selectivo transmitido através do genoma pela estrutura interdependente de cada distribuição multi-*locus*», ou seja, os *loci* mais directamente afectados por interacções selectivas arrastam consigo outros *loci* que de alguma maneira interagem com eles, e esta rede de interacções é de tal modo difusa que os marcadores genéticos analisados (neste caso, os *loci* das esterases) apenas servem para evidenciar que existe selecção, sem que se possa dizer *como* ela é transmitida dos *loci* onde ela se exerce mais directamente para esses marcadores [Ziehe & Müller-Starck 1991].

Há outras demonstrações deste fenómeno em *loci* enzimáticos, por exemplo no caso da fosfoglucoase isomerase, referenciado anteriormente (cf. secção 1) e no acompanhamento dos padrões adaptativos associados a caracteres biométricos por uma parte da variação isoenzimática (um *locus* para esterase e outro para fosfoglucomutase) [Volis *et al.* 2003, 2005]. Mas revisitando os dados de Bacilieri *et al.* [1996] (figura 2.7 e texto respectivo), nota-se que entre fases sucessivas dum único ciclo de vida as frequências dos genes se alteram marcadamente; é de supor que

elas oscilam em função das vantagens relativas de diferentes alelos no *locus* em diferentes fases do ciclo, o que invalida os cálculos feitos quanto à taxa de hibridismo entre as espécies em questão, como já discutido anteriormente (parte II secção D2, “Interpretação dos marcadores nucleares de hibridismo”). Mais: colocam em causa o pressuposto de neutralidade dos marcadores isoenzimáticos.

Este padrão de oscilações, evidenciando complementaridade entre alelos na determinação do *fitness* máximo, explica não só a existência de polimorfismos, mas também a não-divergência entre (sub)populações de origem comum, mesmo que quase isoladas entre si, pois as frequências dos diferentes alelos, desde que não muito sujeitas aos efeitos da deriva, acabam por convergir para valores semelhantes dumas para as outras, *independentemente do fluxo genético que possa haver entre elas*.

Alguns exemplos em Quercus

Ducousso *et al.* [1993] reviram as publicações de parâmetros populacionais relativos ao género *Quercus*, tendo realçado dois aspectos, que são confirmados na generalidade das revisões e estudos originais realizados entretanto em populações adultas [Sork *et al.* 1993b, Kremer & Petit 1993, Elena-Rosselló *et al.* 1996, Kanazashi *et al.* 1997a, Streiff *et al.* 1998, Chung *et al.* 2002, Jensen *et al.* 2003]: os valores de F_{IS} rondando 0,1 medidos em várias populações de carvalhos americanos que, considerando a ausência de autopolinização, foram interpretados como indicadores de estratificação na reprodução, ou seja, do efeito de Wahlund; e os valores de F_{ST} consistentemente inferiores a 0,1, indicando uma relativa homogeneidade entre populações que foi interpretada, como é usual, pela existência de fluxos genéticos entre populações suficientes para impedir uma divergência pronunciada. Segundo os autores, o primeiro aspecto poderia relacionar-se com a dispersão de sementes preferencialmente a curta distância, levando a que árvores relativamente próximas sejam geneticamente aparentadas e, se estiverem mais representadas na descendência umas das outras, formando grupos subpopulacionais cuja diversificação genética resulta no efeito de Wahlund e o valor positivo de F_{IS} — note-se que esta situação é longe de ser generalizada, como se demonstrou pelos valores de F_{IS} em vários *loci* enzimáticos de *Q. ilex*, cujo afastamento do valor 0 praticamente correspondia ao erro estatístico [Michaud *et al.* 1995]. O segundo aspecto parece ligar-se à distância de dispersão através do pólen, que teria de atingir mais de 100 Km, assim colocando em contacto entre si

povoamentos que possam estar praticamente isolados entre si no que respeita à dispersão através da semente; note-se que esse valor não é confirmado pelas análises mais recentes, e provavelmente a homogeneidade entre populações é mantida por selecção estabilizante nos diversos *loci* polimórficos analisados.

– Em *Q. suber* o valor médio de A_e obtido de 14 *loci* variou entre 1,24 e 1,31 na Península Ibérica, enquanto para os 9 *loci* polimórficos se acharam valores de F_{ST} entre 1 e 6% [Jiménez *et al.* 1999]; porém, noutros estudos nesta espécie a diferenciação entre populações traduziu-se em valores bastante mais elevados, F_{ST} entre 2 e 36% (13 *loci* polimórficos, Península Ibérica [Elena-Rosselló *et al.* 1996]) ou G_{ST} entre 3 e 18% (7 *loci* polimórficos, bacia ocidental do Mediterrâneo [Toumi & Lumaret 1998]), sendo incerto se estas diferenças se deveram à discrepância entre *loci* amostrados, talvez decorrente da utilização de folhas. Quanto à opinião desta diferenciação mais elevada dever-se à detecção, nalgumas populações, de genes presumivelmente de *Q. ilex* [Toumi & Lumaret 1998], contrasta com a omissão da mesma para os valores de G_{ST} entre 6 e 17% num estudo análogo em *Q. ilex* [Michaud *et al.* 1995].

– Os estudos em *Q. petraea* e *Q. robur*, na Europa, mostram que as duas espécies são bastante semelhantes em termos de polimorfismo e de diferenciação populacional: os valores médios de A_e (ou v) oscilam entre 1,25 e 1,49, enquanto os valores de F_{ST} ou G_{ST} são bastante baixos, na ordem de 2 a 3% (os valores de δ tendem a estar perto de 7 a 9%) [Herzog 1996]. Trata-se dum elevado polimorfismo para *loci* enzimáticos (maior do que a tendência das perenes arbóreas e arbustivas [Hattermer 1991, Hamrick *et al.* 1979]), cada população evidenciando o mesmo fundo genético que as restantes da mesma espécie. A distância genética d_0 , entre populações da mesma espécie, é apenas um pouco inferior à que separa estas duas espécies [Herzog 1996], sugerindo-se daí uma elevada proximidade filogenética de ambas. Nestas duas espécies, a investigação dos genótipos de 11 *loci*, em árvores adultas para as quais foi avaliado o respectivo grau de vitalidade (avaliado por caracteres morfológicos), demonstrou que, apesar de não haver aparente redução do polimorfismo genético (v) em árvores menos saudáveis, estas tinham um maior coeficiente de fixação F , ou seja, menor heterozigose [Hertel & Zarpel 1996].

– Gram & Sork [2001], a partir de amostras de 9 locais onde predominam *Q. alba*, *Carya tomentosa* Nuttall (Juglandaceae) e *Sassafras*

albidum (Nuttell) Nees (Lauraceæ), distando entre si quando muito de duas dezenas de quilómetros, seguiram um procedimento de análise para o conjunto dos *loci* enzimáticos estudados, compatível com estatística multivariada, em que para cada indivíduo se construiu um vector genotípico (cada elemento descrevendo um gene diferente, com valores de 0 a 1, desde a ausência à homozigose). Nas 3 espécies foi identificada uma forte influência da estrutura florestal (densidade do povoamento, idade, etc.) nos genótipos observados, em contraste com a aparente independência de características abióticas de cada povoamento (tipo de solo, ponto cardeal de exposição ao Sol). No caso de *Q. alba*, 10 genes de 5 *loci* serviram para evidenciar correlações entre genótipos (especialmente no alelo 2 duma fosfoglucoose isomerase) e densidade de árvores, principalmente das da classe de maior diâmetro (DAP maior ou igual a 37 cm). Nas outras espécies, foram diferentes as correlações detectadas entre genótipos e estrutura florestal. As variáveis relacionadas com a estrutura florestal são elas mesmas, na opinião dos autores, «bioensaios do ambiente», tendo de procurar-se a um nível de refinamento muito maior as causas primárias da variação a esse nível, às quais então se poderia atribuir um papel selectivo.

— O estudo de 18 populações de *Q. petraea* abrangendo várias regiões da distribuição desta espécie [Zanetto *et al.* 1993] revelou diferenças interessantes entre *loci* e entre regiões geográficas, embora difíceis de interpretar. Para 6 *loci* enzimáticos polimórficos e segundo as populações, foi obtido um valor H_e médio entre 0,29 e 0,40 (A_e entre 1,41 e 1,67), mas quando se refizeram os cálculos separadamente para 3 *loci* de enzimas considerados do metabolismo primário — glutamato-oxaloacetato transferase (GOT), fosfoglucoose isomerase (PGI) e fosfoglucomutase (PGM) — os valores médios de H_e eram mais baixos, enquanto para os restantes, considerados do metabolismo secundário — fosfatases ácidas (ACP), diaforase (DIA), menadiona reductase (MR) — eram mais elevados. Os valores de G_{ST} variaram entre 2 e 4%, sem aparentemente distinguirem as duas categorias de *loci*, mas para os *loci* de metabolismo secundário na parte central da distribuição (entre França, Bélgica e Alemanha) eram substancialmente mais baixos (perto de 1%). Embora a interpretação tenha de ficar em aberto, sugeriu-se que se encontraria uma correspondência mais directa entre diferenciação genética (G_{ST}) e geográfica nas actividades enzimáticas codificadas por este grupo de *loci*, já de si com maior riqueza alélica, mas sem se poder definir se seria adaptativa ou meramente estocástica (deriva genética).

— A comparação entre dois povoamentos na bacia do Reno de *Q. robur* contíguos entre si, um deles sofrendo alagamento todos os anos [Herzog & Krabel 1999], com base em 17 *loci* (monomórficos e polimórficos), revelou uma distância genética d_0 de 7,4%. Esta diferenciação entre os dois povoamentos — se bem que pequena — devia-se sobretudo a 3 *loci* (*PGD-A*, *EST-A* e *SKDH-A*, respectivamente para 6-fosfogluconato desidrogenase, esterase e chiquimato desidrogenase), sendo notável um alelo de *EST-A*, que costuma ser raro noutras regiões, aqui ter frequências bastante elevadas: 4,5% no povoamento que não era alagado e de 20% no que era. O facto das frequências deste alelo nas descendências obtidas a partir de sementes destes povoamentos baixarem para 3% e subirem para 29%, respectivamente, era sugestivo duma pressão selectiva associada à ocorrência de alagamentos. Este seria, além disso, mais um exemplo de substanciais flutuações de frequências durante o ciclo de vida, que por analogia com casos estudados mais detalhadamente (analisado na secção anterior) podem estar associados a pressões selectivas. Aliás, variações noutros *loci* entre adultos e descendências do mesmo povoamento contribuíram para uma distância d_0 entre gerações do mesmo povoamento quase tão grande como entre povoamentos.

— A disparidade de características genéticas entre adultos e descendências da mesma população também foi observada noutro estudo em *Q. robur* na bacia do Reno, mas desta vez abrangendo 15 regiões bastante afastadas entre si, e referenciando-se apenas a 6 *loci* polimórficos [Gehle 1999]. Concluiu-se dessa disparidade que não haveria equilíbrio genético, fosse ele neutral ou selectivo, mas de maior importância foi a consequência prática de revelar-se impossível correlacionar materiais de propagação com a sua origem, mesmo utilizando a informação de vários *loci*.

— A amostragem de 56 populações de *Q. ilex* abrangendo grande parte da distribuição actual da espécie [Michaud *et al.* 1995] mostrou que apenas 7 *loci* eram polimórficos (ao contrário de quase todos os outros estudos europeus com *Quercus*, neste usaram-se folhas das árvores adultas). O valor médio de H_e era de 0,22, mas era apenas de 0,13 no que se consideraram populações “marginais” (biótopos extremos para a espécie, em termos de demasiada geada ou excessiva humidade; a única de Portugal, na Ria Formosa, pertencia a este grupo). O valor de G_{ST} , cerca de 10%, encontra paralelo noutros estudos de *loci* enzimáticos a esta escala geográfica [Sork *et al.* 1993b]. Usando análise de

componentes principais (PCA) para os resultados em 5 desses *loci* de 55 das populações, obtiveram-se 3 agrupamentos estatísticos de 42 populações, cujo significado não é fácil de discernir, pois não era aparente qualquer relação com a diferenciação taxonómica (que também é ecológica) entre as subespécies *ilex* e *rotundifolia*, nem com o isolamento geográfico definido no próprio artigo. Para além do número limitado de *loci* polimórficos disponíveis é de notar a ênfase em métodos estatísticos valorizando alelos raros, o que é impróprio tendo em conta a reduzida amostragem por população (rondando 30 indivíduos).

Face ao conhecimento presente, onde os marcadores de DNA trouxeram uma nova luz sobre os mais diversos aspectos da biologia das populações de *Quercus*, a análise isoenzimática fica como uma técnica do passado, que trouxe pouca informação utilizável. Como ilustrado nos estudos aqui resumidos, isso deve-se em parte ao desenho da amostragem, em parte ao tratamento dos dados, e no geral à insistente presunção de neutralidade selectiva destes marcadores.

C — Metodologia

1) Teoria para os padrões isoenzimáticos

Cada amostra submetida a electroforese é uma mistura de enzimas, e a revelação de cada actividade enzimática permite, com base na sua especificidade catalítica, evidenciá-la em relação à cor do gel. Cada enzima migra dentro do gel paralelamente ao eixo formado entre os pólos eléctricos da electroforese e, ao fazer-se a respectiva revelação, para cada amostra pode surgir uma ou mais áreas coradas (“bandas”¹⁵) que evidenciam enzimas de mobilidades diferentes mas com a mesma actividade enzimática (isoenzimas).

Partindo do princípio que cada gene codifica um polipéptido, o número de diferentes bandas duma actividade enzimática por indivíduo depende:

- i) do número de *loci* que a codificam;
- ii) do número de alelos resolúveis após electroforese em cada *locus*;
- iii) do padrão de associação entre polipéptidos para formação de cada enzima activo, seja entre os codificados no mesmo *locus* ou entre os de *loci* diferentes.

¹⁵ O termo “banda” vem do inglês *band*, que no contexto da electroforese se devia traduzir como “faixa” ou “risca”, pois refere-se à figura, paralela ao eixo formado pelas amostras no momento em que a corrente as faz entrar no gel, indicativa da actividade enzimática (ou outra entidade molecular) visualizada.

O caso mais simples é o dos enzimas monoméricos (constituídos apenas por um polipéptido) codificados por apenas um *locus*; assim, cada indivíduo diplóide apresenta apenas 1 ou 2 bandas, consoante seja homozigótico ou heterozigótico, respectivamente; a complexidade aumenta de diversas maneiras, seja por haver *loci* duplicados para a mesma actividade que se expressam separadamente no mesmo material em análise (por exemplo, uma actividade no citosol e outra nos cloroplastos), seja pela associação entre polipéptidos de *loci* diferentes no mesmo compartimento celular. Quando se trata de actividades enzimáticas com um espectro de actividade mais amplo, como é o caso de certas hidrolases, peroxidases, etc. [Johnson 1979], o número de *loci* implicados pode ser elevado e consequentemente encontrarem-se muitas bandas.

Outro factor a levar-se em conta em certos casos é a modificação dos polipéptidos com grupos funcionais que lhes alteram as propriedades de migração no gel: fosfatos, lípidos, etc. [Poly 1997]. As bandas adicionais que resultam não representam genes adicionais, mas aumentam a complexidade da interpretação genética.

Ilustração das interpretações genéticas

Formalmente, a interpretação dos zimogramas obtidos após electroforese faz-se a partir de cruzamentos controlados, com recurso às leis de Mendel, ao conhecimento da ploidia das células donde se extraíram os enzimas e da estrutura quaternária destes. Não existindo esse conhecimento para cada sistema enzimático na espécie em estudo, um ponto de partida defensável é supor-se que espécies congénicas têm a mesma estrutura quaternária.

Em regra, para cada alelo ao qual se atribui uma banda resolvida define-se uma distância de migração no gel, tipificada pelos respectivos homozigóticos nesse *locus*. Nos heterozigóticos, aparecem as posições para os dois alelos, às quais pode ou não juntar-se uma ou mais posições intermédias, dependendo de poderem formar-se estruturas quaternárias mistas. Os exemplos na figura 2.10 ilustram os padrões básicos de variação com segregação de apenas 2 alelos (*a/a'*), usando como exemplos 4 enzimas com diversas estruturas quaternárias.

Na figura 2.11, ilustram-se mais alguns exemplos com séries alélicas ou interacções mais complexas.

2) Aplicação às plantas

A análise isoenzimática em plantas tem como obstáculo frequente a perda de actividade dos enzimas dos tecidos logo que se faz a extracção. O problema reside principalmente na presença de taninos e outros compostos fenólicos, mas também há referências à adsorção das proteínas a estruturas macromoleculares e supramoleculares ionizadas (facilitada pela queda da força iónica no momento da rotura dos vacúolos), como sejam ácidos nucleicos, fibras das paredes celulares (pectinas), ou membranas celulares [Loomis & Bataille 1966, Loomis 1974, Skopes 1987]. Outro factor a ter em conta é a abundância de terpenos e outros metabolitos secundários (ácidos resiníferos, carbonilos, isoflavonas, comarinas, carotenóides, etc.) inibidores das actividades enzimáticas [Loomis 1974].

Os taninos e outros fenóis localizam-se nos vacúolos das células fotossintéticas e só entram em contacto com os restantes constituintes celulares por ruptura do tonoplasto, como por exemplo em tecidos danificados; uma vez libertados, formam complexos insolúveis com as proteínas [Loomis & Bataille 1966, Loomis 1974] e, quando em contacto com o dioxigénio e a pH neutro ou alcalino, ou ainda pela acção das fenoloxidasas (tirosinas) presentes no citosol [Anderson 1968], ionizam-se em quinonas que formam espontaneamente ligações covalentes com as proteínas e as inactivam [Loomis & Bataille 1966, Anderson 1968, Loomis 1974]. A maior ou menor quantidade de taninos e outros fenóis, e a actividade das fenoloxidasas, têm grande relevância fisiológica nomeadamente na defesa das plantas terrestres contra patogénios, de certo modo análoga à formação do trombo na circulação sanguínea, pois resulta num ambiente desfavorável ao crescimento de patogénios nos tecidos danificados ou senescentes, isolando-os dos tecidos sãos [Anderson 1968, Okey *et al.* 1997].

Por isso, a análise isoenzimática em plantas tem de realizar-se ao abrigo destes factores de inactivação. Durante um lapso de tempo prolongado só se conseguiam resultados onde o teor em taninos e outros fenóis fosse baixo, seja nas folhas de certas espécies ou cultivares, ou noutros órgãos com essa característica, como por exemplo gemas ou botões foliares [May 1991], ou ainda estudando actividades enzimáticas que não eram afectadas pelos taninos [Mitton *et al.* 1977]. Embora se conhecesse a acção protectora das actividades enzimáticas de diversos reagentes, a maneira de combiná-los eficientemente parece só ter começado com o estudo de Kelley & Adams [1977] para a extracção a

partir das folhas maduras duma conífera. Envolvia o emprego duma solução tamponada a pH 7, contendo uma alta concentração de antioxidante, um inibidor das fenoloxidasas, e outros compostos complexantes de taninos e de fenóis simples, além do uso de azoto líquido (que protege pela baixa temperatura, facilita a maceração das folhas e cria uma atmosfera não-oxidante), e da inclusão dum conservante e um passo de extracção com álcoois. Esse estudo demonstrava de maneira convincente que só a utilização simultânea de todos esses ingredientes permitia obter zimogramas de qualidade para três actividades enzimáticas que serviam de teste [Kelley & Adams 1977].

Nesse trabalho de Kelley e Adams desembocava pouco mais duma década de sugestões sobre o modo de ultrapassar as contingências da extracção dos enzimas em plantas antes da electroforese. Na tabela 2.6 resume-se uma parte substancial deste conhecimento, coligida para o presente trabalho.

A aplicação destes princípios, com algumas modificações para tornar o procedimento mais expedito e mesmo assim ser adequado para várias espécies de coníferas, foi apresentada por Mitton *et al.* [1979]. Mas nem sempre se considera compensador investir tempo para encontrar condições de extracção que mantenham o máximo número de actividades enzimáticas em solução para cada espécie ou órgão a analisar, além de muitos considerarem criticável a complexidade das soluções usadas na extracção, ela própria um potencial factor de inactivação dalguns enzimas [Soltis *et al.* 1983, Kephart 1990, May 1991, Bult & Kiang 1993]. Talvez por isso se encontre nos anos mais recentes, por exemplo nos *Quercus*, alguma predominância de meios relativamente simples e a preferência por órgãos com menos taninos, que são conservados a temperaturas muito baixas até à extracção, a qual se realiza imediatamente antes da electroforese [Yacine & Lumaret 1989, von Wühlisch & Muhs 1995, Nóbrega 1997, Jiménez 2001].

Tabela 2.6 — Lista das principais opções relativas aos diversos componentes da solução utilizada para extracção de isoenzimas.

Função	Opções	Comentários	Referências ^a
Substâncias tampão	tris, fosfato	pH neutro a alcalino	1, 2, 3, 4
	tris-maleato	pH neutro	4, 5
	maleato, histidina	pH ácido a neutro; histidina complexa catiões divalentes	6, 7
Antioxidantes tiol (neutralizam radicais livres nos grupos tiol reduzidos das proteínas, e podem ter outras funções)	glutathiona, cisteína	não servem para conservação (máximo 24 horas), também são quelantes do Cobre (cf. DIECA) e complexantes de quinonas	4, 7, 8
	2-mercaptoetanol	muito utilizado apesar do mau cheiro e de não servir para conservação (máximo 24 horas), também quelante do Cobre (cf. DIECA)	3, 4, 6, 7, 9
	ditiotreititol (DTT)	reagente “desenhado” para substituir os três anteriores na função antioxidante, permite conservação prolongada	4, 7
	tioglicolato, mercaptobenzotiazol	revertem a oxidação dos fenóis em quinonas	8
Antioxidante não-tiol	ascorbato	neutraliza radicais livres e regenera grupos tiol reduzidos	6
Inibidores de tirosinases	dietilditiocarbamato (DIECA)	quelante do Cobre (cofactor das tirosinases), complexa quinonas	8
	azida, cianeto	competidores do dioxigénio para o centro activo; muito venenosos	
	germanato, tetraborato	inibidores competitivos, também complexam alguns fenóis e glúcidos	2, 11
	metabissulfito	inactivador da tirosinase, reage com polifenóis e quinonas, mas pode ser contraindicado, pois reage com muitos grupos químicos, entre os quais pontes dissulfureto; protege da oxidação	8, 9
Adsorventes de fenóis complexos (taninos) e simples	polivinilpirrolidona (PVP)	macromolécula que mimetiza a ligação peptídica, que é onde se ligam os taninos	1, 6, 8, 9
	polivinilpolipirrolidona (PVPP, Polyclar-AT)	forma insolúvel do anterior	6, 9
	acrilamidas	complementam PVP para derivados do catecol, tirosina	6, 11
	sulfato de protamina, Tween 80	dissociam complexos não covalentes entre proteínas e fenóis	9, 10
	fenoxietanol	complexa fenóis simples	2

Função	Opções	Comentários	Referências ^a
Outros adsorventes	EDTA	quelante de catiões divalentes (cf. Mg^{2+}), também inibidor de proteases	4, 7, 12
	Albumina do soro de bovino (BSA)	adsorvente de polifenóis, polianiões, de ácidos gordos e outros lípidos, etc.; também contribui para uma concentração de proteína adequada para a conservação	4, 6, 7, 9
	dextrano, Ficoll	adsorventes de catiões	4
	resinas de polistireno poroso (Amberlite XAD-2 e XAD-4)	removem detergentes e terpenos, mas o seu uso em coluna não é prático para processar amostras em grande número	9
Estabilizadores e solventes	Mg^{2+}	estabilizador de membranas celulares; a sua remoção pelo EDTA facilita a permeabilização das membranas (como fazem os detergentes)	4
	álcoois	separação de lípidos inibidores	6, 11, 12
	etileno glicol, glicerol	redução da actividade da água, anticongelantes	7, 13
Detergentes	Triton X-100, CHAPS, Tween 80, sais da biliar	não-iónicos excepto CHAPS (aniónico e catiónico); pelo menos o Tween 80 reverte a interacção dos taninos com as proteínas	9, 12, 14
Osmolaridade e força iónica	sacarose, manitol, sorbitol, KCl	regulação da osmolaridade	4, 7
	KCl	regulação da força iónica	7
Inibidores	NaF	inibe glicólise, evitando os efeitos da fermentação láctica no pH	7
	de proteases (diversas classes)	protecção a prazo	7
Conservante	DMSO	protecção a prazo	11

^a 1 [Kephart 1990] 2 [Mitton *et al.* 1979] 3 [Soltis *et al.* 1983] 4 [Theimer 1983] 5 [Bult & Kiang 1993] 6 [Loomis & Bataille 1966] 7 [Skopes 1987] 8 [Anderson 1968] 9 [Loomis 1974] 10 [Goldstein & Swain 1965] 11 [Kelley & Adams 1977] 12 [Penefsky & Tzagoloff 1971] 13 [Gekko & Timasheff 1981] 14 [Hjelmeland 1980]

3) Princípios gerais da histoquímica

A histoquímica baseia-se nas propriedades químicas dos diversos grupos de moléculas biológicas para as diferenciar entre si. O resultado que se espera duma reacção histoquímica é a acumulação dum composto corado que permanece, geralmente pela sua insolubilidade, suficientemente próximo das moléculas a detectar para assinalar a sua localização com exactidão, e precisão, adequadas à escala de resolução a que se observa.

No caso dos enzimas, a propriedade química específica que se explora é o tipo de actividade catalítica, definida no respectivo código preconizado pela Comissão de Nomenclatura da International Union of Biochemistry

and Molecular Biology (Enzyme Commission, EC) [Lehninger 1975, BRENDA]. A visualização de cada actividade enzimática faz-se onde, a partir dum substrato apropriado que é fornecido, se forma o produto resultante da sua catálise — seja pela deposição *in situ* desse produto, dum seu derivado, ou de qualquer subproduto dele dependente, e cuja cor (ou fluorescência) contraste com localizações onde esse produto não se forma.

Particularidades da revelação histoquímica após electroforese

Normalmente, a revelação de actividades enzimáticas após uma electroforese é feita pela catálise específica no próprio gel, de modo a que o local onde existir uma molécula com a actividade a detectar seja assinalado pelo depósito visualizável formado em resultado dessa catálise; na maior parte dos casos a revelação é por contraste positivo, isto é, visualizam-se as actividades enzimáticas pela formação de produtos corados sobre um fundo mais claro (em regra branco ou transparente, segundo se trata de amido ou poliacrilamida), porém há exemplos de contraste negativo (fundo corado, produto mais claro).

Algumas revelações realizam-se, não por imersão do gel na solução de revelação, mas numa camada contendo os ingredientes da reacção que se forma sobre a superfície do gel. Essa camada pode ser de papel de filtro ou de agarose, permitindo concentrar os mesmos ingredientes num volume mais reduzido, aumentando a eficiência das reacções para um igual consumo de reagentes [Soltis *et al.* 1983, Allen *et al.* 1984, May 1991, Acquaah 1992].

A visualização é macroscópica, e por isso exige uma concentração relativamente elevada de enzima para que seja perceptível. Este aspecto limita bastante o número de enzimas que podem ser demonstrados nas amostras — por exemplo, é comum actividades abundantes num órgão serem indetectáveis noutros órgãos. Além disso, a distinção entre isoenzimas reside na nitidez das diferenças de migração a partir da origem durante a electroforese, o que só é possível se cada isoenzima tiver uma taxa de migração muito homogénea, traduzindo-se numa zona de coloração estreita (a “banda”), que favorece a sua resolução e, também, a intensidade da coloração.

A matriz dos géis de amido é tão permeável às macromoléculas que as diferenças de migração residem essencialmente nas diferenças de ponto isoeléctrico e do pH escolhido [Acquaah 1992]. Verifica-se empiricamente que o sistema de soluções-tampão usado durante a

electroforese pode interferir com a visualização de vários enzimas: em primeiro lugar, o pH do gel tem de ser adequado para otimizar a separação entre diferentes isoenzimas; em segundo lugar, a química do sistema-tampão pode inviabilizar a nitidez das bandas (presumivelmente por desnaturação parcial durante a electroforese) e até inibir uma actividade enzimática [Acquaah 1992]. Embora existam listas de sistemas de separação para cada actividade enzimática a ensaiar, sugeridas para os diferentes grupos de organismos [May 1991], não é incomum verificar-se que a mesma actividade enzimática é analisada na mesma espécie com sistemas diferentes consoante o laboratório [Micales *et al.* 1986, Selander *et al.* 1986, Kephart 1990, May 1991, Bult & Kiang 1993]. A experimentação com diferentes alternativas é um passo preliminar geralmente incontornável.

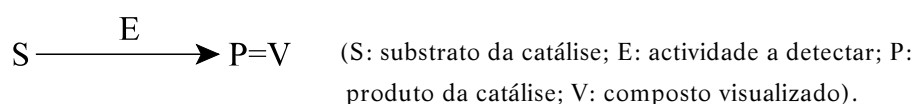
O mesmo trabalho de experimentação de alternativas pode ser necessário, ocasionalmente, também para a revelação de algumas actividades enzimáticas, seja no pH do tampão ou até na escolha do substrato mais adequado.

Finalmente, ao contrário do que é norma na histoquímica para microscopia, as actividades enzimáticas não são fixadas *in situ* após a electroforese, difundindo e decaindo rapidamente. Por isso é indispensável proceder à revelação imediatamente.

4) Tipos de reacções de revelação

Entre a catálise realizada *in situ* e a correspondente visualização podem ou não intercalar-se processos mais ou menos indirectos, e em função disso (não obstante poderem adoptar-se outros critérios, cf. Gabriel [1971], Heeb & Gabriel [1984], Gabriel & Gersten [1992]) definem-se aqui 3 classes de sistemas de revelação após a electroforese: a visualização directa do produto de catálise, o uso dum reagente de captura para precipitar o produto da reacção, e o encadeamento de reacções que conduzem à formação dum precipitado corado.

Visualização directa do produto da catálise



O produto da reacção é a entidade visualizada. Globalmente designados como métodos autocrómicos [Gabriel 1971, Heeb & Gabriel 1984, Gabriel & Gersten 1992], segundo o tipo de visualização podem dividir-se em 2 grupos:

Produto visível por contraste negativo em luz normal, exemplos: para

a CAT (catalase, EC 1.11.1.6), a reacção do tiosulfato de sódio com KI produz I_2 , que cora o amido de negro-azulado, a servir de fundo excepto onde a produção de dioxigénio (O_2) pela catálise inibe a formação desse I_2 [Gabriel 1971, May 1991, Acquaah 1992]; para a SOD/TO (superóxido dismutase/tetrazólio oxidase, EC 1.15.1.1), a foto-redução espontânea de NAD/PMS traduz-se na redução do tetrazólio NBT e consequente escurecimento do fundo (cf. encadeamento de reacções), excepto onde se forma O_2 pela catálise, que inibe essa foto-redução [Micales *et al.* 1986, May 1991, Gabriel & Gersten 1992, Acquaah 1992].

Produto autofluorescente sob luz UV (NADH, derivados de naftol ou de 4-metilumbeliferil, MeU), exemplo: EST-F (esterases, EC 3.1.1.2), o substrato é MeU-acetato ou MeU-butirato, e a hidrólise liberta o MeU fluorescente [Weder & Kaiser 1995, May 1991].

Combinação do produto da catálise com um reagente de captura



O produto da reacção forma com um reagente de captura um composto insolúvel que é visualizado. Grande parte destas reacções envolvem moléculas da família dos diazónios, exemplos: para a AAT/GOT (aspartato aminotransferase/ glutamato-oxaloacetato transaminase, EC 2.6.1.1) o substrato é natural (aspartato + α -cetoglutarato), formando-se oxaloacetato que é “capturado” por um diazónio, geralmente o Fast Blue BB [Gabriel 1971, Soltis *et al.* 1983, May 1991, Acquaah 1992, Bult & Kiang 1993]; para a ACP (fosfatase ácida, EC 3.1.3.2), o substrato é não-natural (α -naftil fosfato), e a captura faz-se entre o naftilo, formado após a hidrólise do éster de fosfato, e um diazónio como Fast Garnet ou Fast Black K [Heeb & Gabriel 1984, Micales *et al.* 1986, May 1991, Acquaah 1992, Bult & Kiang 1993]. Derivados de naftilo são usados para diversas hidrolases.

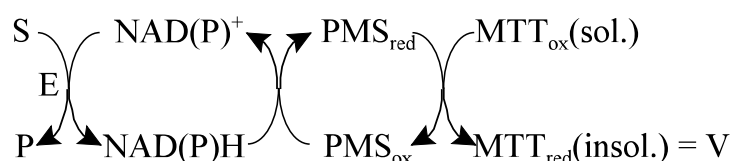
A formação de precipitados incolores, mas visíveis em géis transparentes (de poliacrilamida, nomeadamente), faz-se por acoplamento dum produto da catálise (fosfato, pirofosfato, ou CO_2) com Cálcio na solução, exemplos: AKP (fosfatase alcalina, EC 3.1.3.1) usando *p*-nitrofenil fosfato e 10 mM Ca^{2+} a pH 10, PyrDC (piruvato descarboxilase, EC 4.1.1.1) usando 2 mM Ca^{2+} [Nimmo & Nimmo 1982, Heeb & Gabriel 1984, Gabriel & Gersten 1992].

A detecção das PER (peroxidases, EC 1.11.1.7), que produzem O_2 , faz-se pela oxidação de 3-amino-9-carbazol, precipitando-o [May 1991, Acquaah 1992].

Encadeamento de reacções a partir de cofactores da catálise

Em termos gerais, um dos produtos da reacção é o substrato que serve de ponto de partida para outras reacções, enzimáticas ou não, que resultam mais ou menos indirectamente na formação do composto de visualização.

Quando um dos produtos da reacção é NADH ou NADPH, transfere os seus equivalentes redutores para um tetrazólio, geralmente o MTT — abreviatura para brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio — que na forma reduzida (formazano) é de cor intensa e insolúvel. O encadeamento de reacções é não-enzimático e envolve dois ciclos redox, um repondo a forma oxidada do coenzima, outro envolvendo metossulfato de fenazina (PMS), que transfere os equivalentes redutores do produto da catálise enzimática para o tetrazólio:



Outro tetrazólio utilizado, embora muito menos que o MTT, é o NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*). São exemplos deste tipo de revelação dependentes do NAD as actividades ADH (álcool desidrogenase, EC 1.1.1.1), GAPD (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, EC 1.2.1.12), LDH (lactato desidrogenase, EC 1.1.1.27), MDH (malato desidrogenase, EC 1.1.1.37), etc.; entre as dependentes do NADP, a G6PD (glucose 6-fosfato desidrogenase, EC 1.1.1.49), IDH (isocitrato desidrogenase, EC 1.1.1.42), ME (enzima málico, EC 1.1.1.40), PGD (6-fosfogluconato desidrogenase, EC 1.1.1.44), etc..

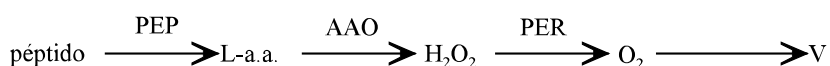
Uma modificação do encadeamento acima emprega-se nas actividades que utilizam NAD(P)H (reacção inversa), transferindo os equivalentes redutores para um substituto da forma oxidada de PMS, 2,6-diclorofenol indolfenol (DCPIP) ou alternativamente menadiona, daí passando-os para o MTT. Exemplo: DIA/MenR (diaforase/menadiona reductase, EC 1.6.4.3 ou 1.6.99.—), que utiliza NADH [May 1991, Acquaah 1992, Bult & Kiang 1993].

Um outro tipo de encadeamento redox foi proposto para a revelação

de fosfo-hidrolases, em que o produto (ortofosfato) reduz o ácido molíbdico, transferindo-se o equivalente redutor através duma tetrabase (em alternativa à benzidina) para amónia e permanganato, formando um precipitado azul [Lomholt 1975].

Nesta classe de sistemas de revelação incluem-se os encadeamentos que envolvem reacções enzimáticas (catalizadas por enzimas incluídos na solução de reacção), no que se designa por acoplamento enzimático. A visualização faz-se a partir da actividade dum enzima indicador, o qual depende mais ou menos indirectamente da actividade inicial que se pretende detectar, e cuja posição fica marcada no gel. Aqui pode haver encadeamentos mais ou menos complexos, a maior parte conduzindo a um enzima indicador donde resulte a produção de NADH ou NADPH e consequente depósito de formazano — por exemplo, as actividades que produzem glucose 6-fosfato (designadamente a PGI-fosfoglucoisomerase, EC 5.3.1.9, a PGM-fosfoglucomutase, EC 2.7.5.1, e a HKX-hexokinase, EC 2.7.1.1) são reveladas por encadeamento com a G6PD, a ACO (aconitase, EC 4.2.1.3) com a IDH, a FUM (fumarase, EC 4.2.1.2) com a MDH, a PK (piruvato quinase, EC 2.7.1.40) com a LDH, a TPI (triose fosfato isomerase, EC 5.3.1.1) com GAPD, etc. [Micales 1986, May 1991, Acquaah 1992].

Há actividades enzimáticas cujos produtos são detectados através dum múltiplo encadeamento enzimático. É o caso das PEP (peptidases, EC 3.4.11.— ou 3.4.13.—), onde se usa PER como indicador mas cujo substrato (H_2O_2) é produzido por uma L-aminoácido oxidase (AAO) [May 1991]:



Outro exemplo é o da MPI (manose 6-fosfato isomerase, EC 5.3.1.8), cujo produto imediato é a fructose 6-fosfato, a partir da qual, através da catálise pela PGI e pela G6PD, produz NADPH que pode visualizar-se pela oxidação dum tetrazólio [May 1991].

D — Comparação genérica com outros métodos de análise molecular

Ressalvando a possibilidade teórica de sequenciar todo o genoma de cada indivíduo, os métodos disponíveis produzem genótipos que constituem uma amostragem da informação presente no seu genoma, e a representação que se consegue desse potencial informativo é diferente

consoante as abordagens metodológicas que são elegidas. É assim que os descritores genotípicos dum indivíduo constituem “marcadores” do seu genoma que, na medida do possível, não se devem afastar de critérios ideais, como sejam: distribuição homogênea por todos os grupos de ligação, representação equilibrada das funções metabólicas existentes, perda de informação se possível nula em relação à variação ao nível da sequência nucleotídica, e, dentro dum certo contexto, neutralidade evolutiva. Outra ordem de critérios tem a ver com a sua aplicação prática, a analisar mais adiante para o hibridismo entre sobreiro e azinheira: facilidade de execução, reprodutibilidade, e economia de meios (nomeadamente, o número de indivíduos que podem ser analisados com os recursos e tempo disponíveis).

1) Fenótipos moleculares não-enzimáticos

Na análise do DNA, dois métodos permitem fazer uma amostragem da informação genómica teoricamente próxima do ideal, já que por princípio os marcadores obtidos são em grande número e distribuem-se aleatoriamente por todos os grupos de ligação, e além disso não estão, pelo menos *a priori*, associados a regiões com uma determinada função genética: os marcadores de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) e dos AFLP (*amplified fragment length polymorphisms*). Ambos se baseiam na utilização de *primers* de PCR arbitrários e produzem, para cada indivíduo, um grande número de fragmentos de DNA amplificado, de que uma proporção relevante é polimórfica. Contudo, trata-se maioritariamente de variações de presença/ausência de cada marcador, de tal modo que em cada *locus* os heterozigóticos não se distinguem dos homozigóticos, e é em geral bastante problemática a possibilidade de haver mais do que um alelo de presença (mas com diferentes tamanhos de fragmento) sejam tratados como não-alélicos. É necessário ter em conta a possibilidade dum ou mais marcadores ser citoplásmico em vez de nuclear [Mariette *et al.* 2002]. Além disso, o RAPD é na prática difícil de reproduzir entre laboratórios [Jones *et al.* 1997], e os AFLP, se bem que altamente reprodutíveis, requerem maior perícia e são especialmente sensíveis, em termos de reprodutibilidade, à maneira como é extraído o DNA [Jones *et al.* 1997, Chavarriaga-Aguirre *et al.* 1999, Heckenberger *et al.* 2003]. O RAPD pode ser muito útil numa análise preliminar da variabilidade genética, e também na identificação de proveniências [Werner *et al.* 1997, Bordács & Burg 1997], mas nem sempre na distinção entre espécies e seus híbridos [González-Rodríguez *et al.*

2004a]; uma vez sequenciados os *loci* RAPD de maior utilidade, podem adoptar-se *primers* selectivos de modo a evidenciá-los, melhor e com maior reprodutibilidade, para análises genéticas [Bodénès *et al.* 1997]. Uma estratégia alternativa de obter sequências selectivas é a análise de diferença representacional [Zoldos *et al.* 2001]. Já os AFLPs, atraentes pela elevada quantidade de informação que trazem numa só electroforese para cada indivíduo, parecem ser mais eficazes para a variação intra-específica do que na diferenciação entre espécies próximas, pelo menos nos *Quercus* [Cervera *et al.* 2000, Kashani & Dodd 2002, Mariette *et al.* 2002, Kelleher *et al.* 2005]; além disso, se o enzima de restrição usado na segunda digestão no protocolo AFLP for sensível à metilação (donde, supõe-se, à regulação da expressão dos genes) podem tornar-se mais evidentes as diferenças entre genomas de espécies próximas [Scotti-Saintagne *et al.* 2004]. Pela cobertura intensa que fazem do genoma, os marcadores de RAPD como os dos AFLPs estão sujeitos a efeitos de selecção direccionada por desequilíbrio de ligação com *loci* adaptativos (efeito *hitch-hike* [Mariette *et al.* 2002, Volis *et al.* 2003]). Por outro lado, é notável a sua utilização como marcadores da resistência poligénica a um patógeno exótico [Dodd *et al.* 2005].

Cabe ainda referir os marcadores ISSR (*inter simple sequence repeats*), que seguem um princípio análogo aos marcadores de RAPD, excepto que os *primers*, semi-arbitrários, hibridam com sequências simples repetidas (micro-satélites) [Zietkiewicz *et al.* 1994]; esta técnica permitiu, por exemplo, aperfeiçoar a interpretação de híbridos no género *Penstemon* [Wolfe *et al.* 1998].

Os SSCP (*single-strand conformation polymorphisms*) e os *loci* SSR (*simple sequence repeats*, também chamados “micro-satélites”) são marcadores em geral não associados a segmentos funcionais do genoma, altamente polimórficos e codominantes, permitindo elevadas probabilidades de exclusão, mesmo descontando o chamado “fluxo genético críptico”, suficientes para determinar os progenitores de cada indivíduo, entre outras determinações [Bodénès *et al.* 1997, Dow & Ashley 1997, Isagi 1997, Lexer *et al.* 1999, Aldrich *et al.* 2003, Cottrell *et al.* 2003, Muir & Schlötterer 2005]. Ambos os tipos de marcadores exigem um grande esforço inicial de rastreio do genoma, especialmente se se pretende fazer uma cobertura intensiva do genoma [Heckenberger *et al.* 2003], mas uma vez estabelecidos, o facto de dependerem de *primers* específicos para sequências em geral bem conservadas permite uma “transferência” para espécies congénicas não testadas que tem

sido, pelo menos nos *loci* SSR nucleares, muito bem-sucedida [Hornero *et al.* 2001]. Contudo, isto não exclui a necessidade de aumentar o número de *loci* SSR, que é desejável a todos os títulos [Muir & Schlötterer 2005]. Os alelos nos *loci* SSR distinguem-se pelo número de repetições da sequência “simples” que contêm, e a taxa de mutação por duplicação ou deleção é invulgarmente elevada [Chakraborty *et al.* 1997]; em princípio aplica-se o modelo de mutação *stepwise*, com estatísticas próprias, seja adaptando os conceitos de distância genética [Goldstein *et al.* 1995, Shriver *et al.* 1995] ou do F_{ST} em termos de tempo de coalescência de linhagens evolutivas [Slatkin 1995], mas a comparação entre estatísticas no tratamento dos dados nem sempre confirma as vantagens desse modelo [Goldstein *et al.* 1995, Cottrell *et al.* 2003]. A possibilidade de haver um marcador SSR com um polimorfismo demasiado elevado em relação aos restantes pode originar distorções na análise [Walter & Epperson 2004]. Pode economizar-se na utilização de marcadores SSR juntando vários *loci* na mesma análise electroforética [Hornero *et al.* 2001, Dzialuk *et al.* 2005].

O elevado grau de polimorfismo SSCP deve-se à multiplicidade de variações por substituição pontual ou por inserção/deleção que as sequências (por sinal relativamente curtas) comportam [Nataraj *et al.* 1999]. Se de espécies diferentes, moléculas comigrantes num gel SSCP são provavelmente homoplásicas, e não o mesmo “alelo” como por vezes se supõe [Bodénès *et al.* 1997], o que tem de verificar-se ao nível da sequência nucleotídica. Utilizando um princípio semelhante à análise de SSCPs, a análise de heteroduplexos terá até algumas vantagens [Nataraj *et al.* 1999], mas tanto uma técnica como outra têm permanecido em segundo plano, apesar da sua relativa simplicidade operacional.

Quanto ao DNA citoplásmico, mitocondrial ou plastidial, tem três particularidades muito convenientes, que são a existência de múltiplas cópias por célula, a provável neutralidade selectiva da variação, e a hereditariedade uniparental (sem recombinação, portanto). Esta última confere um N_e proporcionalmente inferior ao dos genes nucleares em 4 vezes, e consequentemente uma maior taxa de fixação de que resultam estatísticas de diferenciação populacional muito mais elevadas; foi através desta abordagem que se abriram novas possibilidades para uma reconstrução das rotas migratórias à escala de milhares de anos [Hewitt 1999], ou se detectaram expansões mediadas pela acção humana [Fineschi *et al.* 2000, Cottrell *et al.* 2003, Lumaret *et al.* 2005]. O facto de poder considerar-se em bloco toda a informação do DNA citoplásmico,

isto é, como um haplótipo (ou “alelos ordenados”), torna-o particularmente adequado à aplicação da estatística N_{ST} , na qual as distâncias genéticas entre haplótipos contribuem para a estimativa da diferenciação genética intrapopulacional (o G_{ST} é o caso particular em que as distâncias entre haplótipos são unitárias) [Pons & Petit 1996]. Paradoxalmente, é na distinção entre espécies que este tipo de marcadores não tem grande utilidade, senão a de evidenciar uma extensa partilha de caracteres, como foi discutido anteriormente para os *Quercus* (parte II, secção D2, e parte III, secção C2 [Whittemore & Schaal 1991, Petit *et al.* 1997, Dumolin-Lapègue *et al.* 1997a, Bordács 2000, Belahbib *et al.* 2001, Collada *et al.* 2002, Finkeldey & Mátyás 2003, González-Rodríguez *et al.* 2004b, Lumaret *et al.* 2005]), e também se constata noutros grupos [Clark *et al.* 2000, Vendramin *et al.* 2000].

Sendo todos estes marcadores amostragens dos polimorfismos ao nível de sequência nucleotídica, o estudo directo destes (*single nucleotide polymorphisms* ou SNPs, pequenas inserções e deleções), tornado relativamente acessível com os desenvolvimentos no estudo de genomas, deverá constituir o padrão de referência para todos os outros marcadores. No contexto da inferência filogenética, os *loci* de rDNA têm um já longo historial e também foram estudados nos *Quercus* [Manos *et al.* 1999, 2001, Bellarosa *et al.* 2005], porém a análise das sequências requer algumas precauções [Mayol & Rosselló 2001, Bellarosa *et al.* 2005].

Dentro deste panorama, são vários os problemas associados à utilização dos polimorfismos enzimáticos. Além da grave questão que constitui a interpretação ecológica dos polimorfismos, que só no caso de serem neutrais podem ser extrapoláveis para o restante genoma onde também se aplique esse pressuposto, há a questão da amostragem que fazem do genoma [DeWoody & DeWoody 2005]. Assim, estão em causa apenas alguns genes que codificam proteínas evidenciáveis num gel após electroforese, na sua maior parte enzimas suficientemente abundantes para os quais existam métodos de revelação [Herzog, 1996]. A esta selectividade da amostragem acresce a reduzida sensibilidade desta metodologia, dependente de substituições de resíduos de aminoácidos com alteração da carga eléctrica. Embora seja corrente considerar-se que essa redução atinge $\frac{3}{4}$ do total [Chakraborty & Nei 1976, Nei 1987], a partir das matrizes de substituição BLOSUM [Henikoff & Henikoff 1992] deverá considerar-se mais correcto um valor à volta de 60% (cf. Apêndice II secção B para os cálculos), isto é, em cada 5 substituições há em média 3 que não implicam, nas posições em que ocorrem, uma

mudança de carga eléctrica. A escolha dum ou outro valor, dentro da perspectiva da variação neutral, afecta sobretudo a estimativa da taxa de substituição dos alelos nas populações e consequente calibração do chamado relógio molecular [Nei, 1987]. Já em géis de poliacrilamida a geometria dos isoenzimas também contribui para separá-los, podendo detectar-se mais variações a nível polipeptídico, possivelmente até ao dobro [Johnson 1979], o mesmo se passando com a focagem isoelectrica. Em todos os casos, será difícil considerar que algum estudo dos fundos genéticos das populações através de polimorfismos em *loci* enzimáticos constitua uma amostragem satisfatória do real grau de polimorfismo existente. Ao que parece, mesmo os marcadores SSR e até os SNPs são limitados [DeWoody & DeWoody 2005].

No lado positivo, a universalidade dos métodos de revelação para cada actividade enzimática faz com que os *loci* enzimáticos possam ser estudados em qualquer espécie praticamente sem requererem um trabalho preliminar de detecção e validação de marcadores genéticos, que as abordagens baseadas no DNA impõem em maior ou menor grau. Há a questão de manter as actividades enzimáticas em solução até ao passo da revelação, que nas plantas pode ser bastante problemática como discutido anteriormente; mas uma vez ultrapassado esse obstáculo, o atractivo de ter potencialmente à disposição dezenas de *loci* para cada amostra é de grande relevância, a que se juntam a sua já longa utilização e a economia de implementação em amostragens de grandes dimensões [May 1991, Chavarriaga-Aguirre *et al.* 1999, Sork *et al.* 1999].

2) Vantagens e limites para o problema científico a abordar

Para detectar híbridos de sobreiro com azinheira entre as descendências, e estimar a taxa de hibridismo que se encontra nos materiais de propagação, a abordagem a adoptar deverá maximizar a satisfação de critérios de eficiência definidos *a priori*, e que são:

Capacidade de discriminação entre sobreiro, azinheira e os respectivos híbridos. Idealmente, buscam-se *loci* monomórficos em cada uma das espécies, com genótipos diferentes (facilmente diferenciáveis) entre uma e outra, e com distinção dos genótipos heterozigóticos dos híbridos. Se a diferença dos fenótipos moleculares for muito pequena entre as duas espécies, podem surgir dificuldades de interpretação, especialmente na distinção dos genótipos híbridos. *Loci* polimórficos, numa ou nas duas espécies, podem ter uma variabilidade tal que haverá sempre um risco de

certos fenótipos moleculares se sobreporem entre as duas espécies ou entre estas e os híbridos.

Os 2 critérios práticos para avaliar a capacidade discriminante dum *locus* são, como em qualquer procedimento de classificação de amostras, a especificidade e a sensibilidade, ou seja, as medidas de susceptibilidade aos falsos positivos e falsos negativos (respectivamente).

Uma amostra classificada como híbrido em função dum marcador genético, mas não o sendo, é um falso positivo. Um *locus* que produz falsos positivos perde especificidade como marcador genético. A especificidade a 100% (ausência de falsos positivos) é desejável, porém isso não obsta ao aproveitamento da informação dum *locus* se esta se julgar *suficientemente* específica, porque pode clarificar a informação fornecida por outros marcadores. No entanto, é necessária uma grande amostragem de populações-padrão, tanto maior quanto maior o número de alelos nesse *locus* em cada uma das espécies, para fazer esse julgamento.

Os falsos negativos são amostras cujos marcadores genéticos não evidenciam o seu hibridismo, apesar deste ser real. Um *locus* que produz falsos negativos perde sensibilidade como marcador genético. No caso da primeira geração de híbridos interspecíficos (F_1), quanto maior o número de *loci* discriminantes utilizados, mesmo que individualmente não sejam 100% sensíveis, menor é o risco de ocorrerem falsos negativos. Contudo, à medida que são mais remotas das F_1 que lhes deram origem, as gerações descendentes são cada vez mais difíceis de distinguir das espécies progenitoras da F_1 , por dois motivos: a progressiva diminuição da probabilidade de heterozigose interspecífica em cada *locus* discriminante, considerando que o padrão de reprodução é predominantemente o retrocruzamento com apenas uma das espécies progenitoras da F_1 ; e a presumível selecção disruptiva nas linhagens descendentes dos F_1 [Rieseberg & Linder 1999, Nason *et al.* 1992], que reduz ainda mais a dita probabilidade. Na realidade, apenas a análise de muitos *loci* (se possível, distribuídos uniformemente por todo o genoma), e preferencialmente por complementaridade entre diferentes métodos de análise, pode permitir uma razoável sensibilidade em gerações remotas.

Acresce que, na prática, a abordagem adoptada deve garantir uma percentagem de indeterminação tão baixa quanto possível, e a máxima reprodutibilidade, para que a especificidade e a sensibilidade não sejam comprometidas.

Custo de aplicação em larga escala. No rastreio de populações ou

materiais de propagação florestais, as respostas esperadas dependem da capacidade de produzir informação para um grande número de amostras, que podem ser na ordem de vários milhares. Os custos a ponderar são de dois tipos: consumíveis (reagentes, etc.) e equipamentos, por um lado, e tempo de execução por outro.

Investimento experimental prévio. A cada método correspondem requisitos diferentes de aplicação, seja na sua implementação inicial (dificuldades intrínsecas ao método) seja na sua adaptação ao problema particular, neste caso o da detecção de hibridismo. A generalidade dos marcadores de DNA úteis são fruto duma selecção prévia que pode ser bastante morosa, mas uma vez conseguida, se as sequências específicas utilizadas estiverem conservadas evolutivamente, pode adaptar-se prontamente a outras espécies congénicas.

Dentro deste conjunto de critérios, as diferentes classes de marcadores de DNA em sobreiro e azinheira poderão oferecer vantagens como sofrer limitações. No caso do DNA citoplásmico, a ausência de discriminação entre espécies, repetidamente evidenciada dentro do género *Quercus* (cf. Parte II secção D2), não pode mais do que apontar o sentido predominante da hibridação à escala geológica, sem com tal permitir qualquer estimativa do grau de introgressão, pois a uniparentalidade da hereditariedade citoplásmica não se correlaciona com a transmissão dos genes nucleares, tal que tanto pode haver praticamente “puros” no genoma nuclear mas com DNA citoplásmico da outra espécie, assim como os pode haver com DNA citoplásmico da própria espécie mas com forte introgressão do genoma nuclear da outra espécie.

Marcadores SSR ou SSCP têm a desvantagem, neste contexto, de serem muito polimórficos. Por isso a “transferência” de marcadores SSR, de *Q. myrsinifolia* Blume (= *Q. glauca* Thunb.), *Q. macrocarpa*, *Q. petræa* e *Q. robur*, para sobreiro [Hornero *et al.* 2001], e sobreiro e azinheira [Soto *et al.* 2003], que por certo terá grandes aplicações onde este tipo de marcadores têm revelado maior utilidade (análise de parentesco, medição directa do fluxo genético), não deverá ter grande potencial para o problema aqui em análise. Se se comprovar que o elevado polimorfismo nos *loci* SSR flutua à volta de valores mais ou menos constantes entre espécies congénicas [Hornero *et al.* 2001], então será fácil encontrarem-se em cada *locus* alelos que numa das espécies têm migração mais rápida que os da outra, e outros de migração mais lenta, e nesses *loci* a discriminação, embora teoricamente possível, pode ficar dificultada pelo requisito de exactidão na estimativa do

tamanho dos segmentos, nomeadamente pela uniformidade da calibração das electroforeses (o mesmo problema pode surgir com os marcadores SSCP, mas talvez não tão sistematicamente). Além disso, as “bandas-fantasma”, comuns em marcadores SSR, praticamente invalidam diferenças de 1 ou mesmo 2 pares nucleotídicos (bp) [Maehara *et al.* 2001]. Assim, dos 6 *loci* SSR nucleares propostos como discriminantes entre sobreiro e azinheira [Soto *et al.* 2003], apenas um (MSQ13) parece ter um bom potencial para este fim (ainda assim, o facto de se tratar duma amostragem de apenas 18 genes de sobreiro e 22 de azinheira deixa em aberto a possibilidade de serem encontrados novos alelos em cada *locus* até aí considerado discriminante, cf. parte III secção D3).

Marcadores RAPD ou AFLP, onde a regra de dominância completa é quase universal para os respectivos *loci* (isto é, os heterozigóticos não se distinguem dum dos homozigóticos), só podem ser úteis se o alelo dominante for nalguns casos o de sobreiro, noutros de azinheira, pois deste modo o hibridismo evidencia-se por um padrão “cumulativo” entre os das duas espécies. Caso esta “alternância da dominância” se verifique, o tipo de amostragem feito do genoma pelos AFLPs e a reprodutibilidade do método permitirão esperar um potencial de detecção de vestígios de hibridismo que nenhum outro método aqui tratado deverá mostrar [Dodd *et al.* 2002]. A possibilidade de introduzir pequenos melhoramentos no desenho dos *primers* [Cervera *et al.* 2000] ainda permite auspiciar para os marcadores AFLP maiores vantagens para a detecção de introgressão.

Comparativamente, os marcadores enzimáticos, mantendo as vantagens do ponto de vista económico e também a de pequeno investimento inicial (se não se contar com a questão genérica de conservar as actividades até ao momento da revelação), não têm sido em geral úteis para detectar hibridismos entre espécies próximas, por não serem suficientemente específicos [Rushton 1993, Kremer & Petit 1993, Zanetto *et al.* 1994, Tomlinson *et al.* 2000]. Mesmo assim, foi esta a abordagem proposta para os de sobreiro e azinheira com o projecto PAMAF 8153, que esteve na origem do presente trabalho; em parte, por não existir nenhum trabalho prévio com outro tipo de marcadores, mas também porque se assumia um maior grau de afastamento filogenético entre estas duas espécies, influenciado pelo esquema da *Flora Europæa* [Tutin 1964], o que daria *a priori* algumas esperanças para a existência de marcadores específicos analisáveis com esta técnica.