

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**POLIMORFISMO ISOENZIMÁTICO EM *QUERCUS SUBER* L.
CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA SUA RELAÇÃO COM A
QUALIDADE DA CORTIÇA**

Maria Filomena de Sousa Nóbrega

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia
para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Florestal

Lisboa * 1996

À minha mãe, pela imensa ternura e pelas conversas
que nunca poderemos ter acerca do que agora
escrevo.

Ao meu pai, pelo carinho e grande amor.

E a ti, meu filho, participante desta caminhada.

Agradecimentos

Ao Professor Raúl Sardinha, por me ter proposto investigar o polimorfismo isoenzimático do sobreiro. Pelo apoio incondicional e confiança que sempre me dispensou em todos os projectos que se desenvolveram desde então. Pelas condições materiais que sempre me pôs à disposição e pelos contactos que me proporcionou para que pudessem ser alcançados os objectivos científicos propostos.

Ao Professor Bruno de Sousa, meu orientador científico, pela grande amizade que demonstrou em todo o apoio prestado durante estes anos. Pelo muito tempo que dedicou e pelos muitos conselhos, sempre importantes e elucidativos, que me permitiram ultrapassar todas as dificuldades. Pela revisão cuidada e minuciosa deste manuscrito.

Ao Doutor Engenheiro Luís Carneiro, pela disponibilidade sempre mostrada e pelo óptimo acolhimento que me dispensou. Pelo saber e conhecimentos que me pôs à disposição na execução e análise de resultados, e que em muito contribuíram para a qualidade final desta dissertação.

Ao Doutor Valente de Almeida, pelo interesse e pelas muitas conversas que tivemos sobre os resultados deste trabalho.

Aos Engenheiros Técnicos Agrários Rui Nogueira e Martins, pelo esforço incansável e eficiência na colheita do material.

À Isabel Carvalho, do Departamento de Química Agrícola e Ambiental do Instituto Superior de Agronomia, pelo óptimo acolhimento no seu laboratório, onde tive o primeiro contacto com as técnicas electroforéticas. Pelo apoio em equipamento e metodologia que me dispensou, auxílio e amizade prestados ao longo deste trabalho.

À Isabel Nunes, pela grande ajuda e elevado grau de profissionalismo que revelou durante a execução do trabalho experimental.

À Cecília Trigo, pelo profissionalismo, cuidado e perfeição que dispensou no arranjo gráfico do trabalho.

A todos os meus colegas e amigos com que pude sempre contar nas fases mais críticas deste trabalho.

Índice	Pág.
AGRADECIMENTOS	i
ÍNDICE	iii
RESUMO.....	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ISOENZIMAS.....	5
2.1. Perspectiva histórica.....	5
2.2. Ocorrência e localização das isoenzimas	7
2.3. Vantagens e limitações da aplicabilidade das isoenzimas.....	8
2.4. Visualização e interpretação das isoenzimas.....	10
2.5. Preparação da amostra	12
2.5.1. Material vegetal.....	14
2.6. Detecção da actividade enzimática	16
3. APLICAÇÕES DOS ESTUDOS ISOENZIMÁTICOS.....	18
4. ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE ESPÉCIES FLORESTAIS	21
4.1. Variabilidade genética intravarietal.....	22

Índice	Pág.
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. Material	26
5.2. Métodos	29
5.2.1. Extracção das isoenzimas do pólen	29
5.2.2. Electroforese em gel de poliacrilamida	29
5.2.3. Métodos de taxonomia numérica para análise dos dados	30
5.2.3.1. Análise dos dados electroforéticos.....	31
5.2.3.2. Análise dos dados da morfologia da cortiça	34
5.3. Delineamento experimental	37
5.4. Revelação das enzimas	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1. Estudo dos sistemas isoenzimáticos	44
6.1.1. Estimativa do polimorfismo intrapopulacional.....	44
6.1.2. Análise dos dados electroforéticos	52
6.2. Descrição morfológica da cortiça	65
6.2.2. Análise da morfologia por métodos de taxonomia numérica.....	67
7. CONCLUSÕES.....	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

Índice

- ANEXO I - Critério de pontuação ponderada utilizado na classificação e ordenamento qualitativo dos diferentes sobreiros
- ANEXO II - Soluções tampão e aditivos para a extracção das isoenzimas em folhas
- ANEXO III - Soluções tampão e aditivos para a extracção das isoenzimas em pólen
- ANEXO IV - Sistemas de revelação dos sistemas enzimáticos
- ANEXO V
- Quadro 1 - Registo do zimograma referente ao sistema enzimático α,β -carboxilesterases
- Quadro 2 - Registo do zimograma referente ao sistema enzimático fosfatase ácida
- Quadro 3 - Registo do zimograma referente ao sistema enzimático aspartato aminotransferase
- Quadro 4 - Registo do zimograma referente ao sistema enzimático fosfogluose isomerase
- Quadro 5 - Registo do zimograma referente ao sistema enzimático álcool desidrogenase
- Quadro 6 - Registo do zimograma referente ao sistema enzimático leucina aminopeptidase
- ANEXO VI - Registo do conjunto de bandas analisadas nos seis sistemas enzimáticos (matriz de dados)
- ANEXO VII - Registo das características morfológicas da cortiça para as 59 árvores (matriz de dados)

Resumo

Com o presente trabalho pretende-se dar um contributo para um melhor conhecimento da variabilidade genética do sobreiro (*Quercus suber* L.), e pesquisar possíveis relações entre os modelos da variabilidade genética e da variabilidade fenotípica da qualidade da cortiça, através do estudo do polimorfismo isoenzimático.

Na primeira parte, apresenta-se uma reflexão geral sobre o polimorfismo bioquímico e causas da sua ocorrência, vantagens, limitações da sua aplicabilidade, referindo-se a técnica electroforética habitualmente utilizada para o evidenciar.

Após ensaios preliminares para otimizar as condições de trabalho, realizaram-se as análises isoenzimáticas em 69 árvores previamente seleccionadas, por electroforese em gel de poliacrilamida, revelando-se os sistemas enzimáticos: α,β -carboxilesterases (EC.3.1.1.1), fosfatase ácida (EC.3.1.3.2), aspartato aminotransferase (EC.2.6.1.1), fosfoglucose isomerase (EC.5.3.1.9), álcool desidrogenase (EC.1.1.1.1) e leucina aminopeptidase (EC.3.4.11.1).

Com base nos resultados obtidos, estimou-se a variabilidade genética intrapopulacional aferida pelos índices de polimorfismo, e efectuou-se a análise dos resultados recorrendo a métodos de taxonomia numérica.

Discutem-se finalmente algumas possibilidades de aplicação do conhecimento obtido neste trabalho, no apoio a programas de melhoramento do sobreiro, e apresentam-se ainda algumas perspectivas futuras para o seu desenvolvimento e aprofundar de conhecimentos, relacionados com esta espécie.

Summary

The objective of this study is to help to improve knowledge on the genetic variability of cork oak (*Quercus suber* L.) owing to isoenzymatic polymorphism, and to explain the possibility of the correlation between isozyme banding patterns and the qualitative characteristics of the cork tissue.

The first part describes, in general terms, the characteristics of isozymes as biochemical markers and their mechanisms of occurrence, advantages and limitations of their applications, and makes reference to the electrophoretic technique used.

After several previous attempts to optimise operating conditions, we analysed six enzymatic systems: α - β -carboxylic esterases (EC.3.1.1.1), acid phosphatase (EC.3.1.3.2), glutamate oxaloacetate transaminase (EC.2.6.1.1), phosphoglucose isomerase (EC.5.3.1.9), alcohol dehydrogenase (EC.1.1.1.1) and leucine aminopeptidase (EC.3.4.11.1), in 69 previously selected cork oak trees, using horizontal polyacrylamide gel electrophoresis.

Based on the isozyme banding patterns, we have estimated the polymorphic indices which provide a relative measure of the intrapopulational variability, and, with the use of numerical taxonomy methods we have analysed the results thereof and the morphological characteristics of the cork tissue.

Finally, several possibilities of how to apply this knowledge to improvement programs and to future research have been discussed.

1. Introdução

Entre as nossas principais espécies florestais, o sobreiro, de origem mediterrânica, é das mais abundantes no nosso País, aparecendo na quase totalidade das regiões do continente português, como mostra o mapa representado na figura 1, e ocupando de área florestal cerca de 21% (INVENTÁRIO FLORESTAL NACIONAL, 1988), com grande importância económica e elevada contribuição para o PNB sectorial, através da produção e transformação de cortiça, o que por si só explica a razão do interesse que esta espécie nos merece.

O sobreiro é explorado em montados, geralmente de origem e regeneração espontâneas, e comporta-se como uma espécie pouco exigente e resistindo a condições adversas de clima.

Já dizia Natividade, “Nenhuma outra árvore dá mais, exigindo tão pouco. Espoliada, talada, saqueada, obstina-se em viver, e não sabemos mais que admirar: se a resistência do sobreiro à ofensiva destruidora, se a cegueira ou a mísera impotência do homem que persiste em não aproveitar a fundo a prodigiosa vitalidade desta árvore, em tirar todo o partido de tão notável capacidade de adaptação”.

O sobreiro (*Quercus suber* L.), espécie tão singular e de características tão peculiares, é uma espécie com elevado polimorfismo, essencialmente alogâmica e tipicamente heterozigótica, originando populações acentuadamente heterogéneas com uma elevada frequência de fenótipos instáveis e geneticamente distintos dos progenitores, devido à segregação e recombinação de genes durante o processo de reprodução natural. Em suma, é uma espécie que pode ser descrita como excessivamente variável em termos de vigor, forma e características e produção do tecido suberoso (NATIVIDADE, 1950).

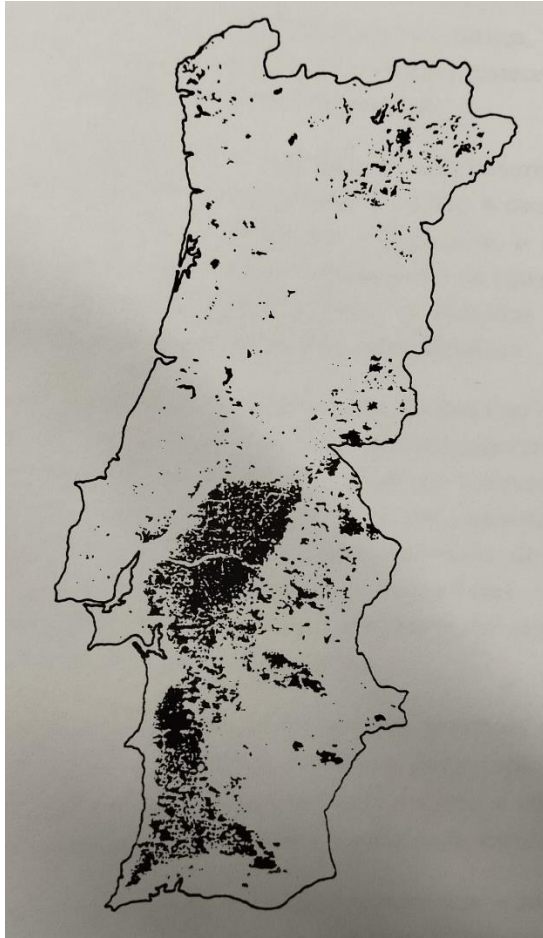


Fig. 1 - Mapa da distribuição do sobreiro

Assim, devido à constituição genética do sobreiro, não existe uma reprodução fiel dos caracteres dos progenitores, observando-se na progenitura de uma mesma árvore diferenças morfológicas tão salientes de indivíduo para indivíduo, particularmente nas características do tecido suberoso, no vigor e na arborescência das árvores, na produtividade, na forma e dimensões dos frutos, que cada indivíduo se pode considerar uma forma botânica diferente (NATIVIDADE, 1950).

A grande variabilidade de qualidades de cortiça, mais significativa dentro das estações ecológicas do que entre estações, parece pois apontar para um elevado controle genético da árvore produtora.

Face ao vazio de informação quanto aos factores que regulam a qualidade do tecido suberoso, nomeadamente quanto à taxa de crescimento e porosidade que condicionam fortemente a qualidade, o longo período de crescimento da espécie, a ausência de conhecimento da constituição genética e de

correlações genéticas no estágio juvenil, os métodos convencionais de análise de descendências tornam-se de difícil aplicabilidade.

Em termos de selecção de árvores boas produtoras, e em virtude de o abastecimento de material à indústria transformadora vir revelando abaixamentos sensíveis de qualidade, revela-se conveniente estabelecer medidas apropriadas para a conservação dos recursos genéticos, e produção de mais e melhor cortiça, o que requer, para aceleração do melhoramento e adequado delineamento das respectivas estratégias, a avaliação das componentes de variância atribuíveis ao genoma e influências do meio e o conhecimento da estrutura genética da espécie.

Na perspectiva da conservação dos recursos genéticos, da salvaguarda da biodiversidade e da identificação de causas de degradação dos montados, o conhecimento a adquirir será particularmente valioso e com capacidade de elevado valor acrescentado potencial para a actividade económica.

Outro aspecto igualmente de grande importância económica, é conhecer a distribuição do sobreiro no interior da sua área de prosperidade natural, ou seja, na região mediterrânica ocidental, que está longe de ser homogénea, distinguindo nas zonas do País que apresentam mais interesse suberícola, as zonas boas, as medianas e as fracas. Esta informação tem uma importância crítica se atentarmos ao facto da quase totalidade da regeneração e da actividade viveirista se efectuar com o recurso a material seminal do qual se desconhece a origem e proveniência dentro da zona produtora.

O tradicional acesso para a identificação e caracterização de diferentes indivíduos da espécie baseado em características fenotípicas parece não ser o mais satisfatório, embora continue a desempenhar um papel de fundamental importância, uma vez que os dados que utiliza fornecem pouca informação ao nível do genoma dos indivíduos. A partir de 1970 os polimorfismos isoenzimáticos começaram a ser utilizados em estudos genéticos em espécies florestais. Ainda hoje, a caracterização bioquímica continua a ter um papel importante no melhoramento florestal pela informação que fornece e por ser um meio expedito para discriminação em produtos nos quais a aplicação de descritores morfológicos e fenológicos é retardada, pelo crescimento muito lento das espécies ou pela demora em alcançar o estado reprodutivo, é acessível, rápido e relativamente barato.

O tipo de abordagem bioquímica pode variar, mas as análises baseadas na electroforese e a crescente popularidade e grande utilidade da análise isoenzimática tornaram-se de uso corrente, quer pela objectividade que confere ao estabelecimento de diferenças entre indivíduos e populações quer pelo modo como tais diferenças reflectem, tão estreitamente quanto possível, os genótipos envolvidos.

Na tentativa de contribuir para a melhoria do conhecimento da estrutura genética como instrumento de apoio para o programa de melhoramento da espécie, pretende-se com este trabalho conseguir os seguintes objectivos:

- Estudar a variabilidade genética, através do polimorfismo isoenzimático, procurando-se detectar eventuais diferenças que permitam distinguir diferentes indivíduos e populações.
- Estabelecer possíveis relações entre indivíduos dadores de boa e má cortiça e os seus modelos electroforéticos das isoenzimas, para selecção atempada.

2. Isoenzimas

2.1. Perspectiva histórica

Os indivíduos de uma dada espécie possuem características específicas comuns que os diferenciam de outras espécies, e dentro da população encontra-se pouca variação dessas características. Esses mesmos indivíduos são igualmente portadores de características individuais, muito mais particulares e capazes de os identificar e caracterizar.

Assim, todas as espécies de seres vivos possuem variações intrapopulacionais, nem sempre facilmente detectáveis, e todos os caracteres apresentados por um indivíduo, sejam morfológicos, fisiológicos ou comportamentais, constituem o seu fenótipo.

O aparecimento das características fenotípicas, durante o crescimento e desenvolvimento do indivíduo, deve-se ao material hereditário contido nas suas células, transmitido de geração em geração pela reprodução, e que constitui o genótipo.

Embora a caracterização fenotípica continue a desempenhar um papel de fundamental importância, os dados que utiliza fornecem pouca informação ao nível do genoma dos indivíduos, uma vez que o fenótipo de um indivíduo pode sofrer transformações com a evolução, e também ser alterado por factores ambientais, donde podemos concluir que há uma interacção entre a acção do genótipo e a do meio ambiente.

Nas últimas décadas, a caracterização bioquímica aplicada ao reino vegetal tem vindo a sofrer um notável incremento, nomeadamente pelo desenvolvimento dos métodos analíticos baseados na electroforese, cromatografia e mais recentemente nas técnicas de caracterização de DNA, que apresentam em relação aos métodos morfológicos a grande vantagem de serem um meio expedito na discriminação de determinados compostos químicos nos quais a aplicação de descritores morfológicos e fenológicos é retardada pelo crescimento muito lento das espécies ou pela demora em alcançar o estado reprodutivo.

De entre os métodos bioquímicos, a electroforese de isoenzimas constitui actualmente um instrumento analítico de alta eficácia e precisão, devido à objectividade que confere ao estabelecimento de diferenças entre indivíduos e entre populações e à maneira como tais diferenças reflectem, tão estreitamente quanto possível, os genótipos envolvidos, permitindo o estabelecimento de correlações entre estes e as variações enzimáticas.

O estudo das isoenzimas teve início em 1949 com Mallette e Dawson, com a separação de 5 fracções purificadas de tirosinase em cogumelos *Psalliota campestris*, e a partir da década de 50 desenvolveram-se muitos outros, sendo um dos mais representativos o estudo da actividade enzimática em plantas superiores, nomeadamente beterraba sacarina, tabaco e espinafre, realizado por BOROUGHS (1954), que conseguiu obter mais do que uma fracção enzimática activa fazendo passar preparações purificadas de peroxidase através de colunas Dowex 50. As diferentes propriedades cinéticas e óptimos de pH nas fracções recolhidas, sugeriram a existência de uma mistura de diferentes formas da mesma enzima (MCMILLIN, 1983).

A interpretação dos resultados daquelas experiências suscitou alguma controvérsia sobre se seriam múltiplas formas moleculares diferentes formas da mesma enzima ou produtos resultantes dos processos de extracção e purificação ("artefactos").

Para ultrapassar esta questão, contribuíram os trabalhos realizados por JERMYN (1952), e JERMYN e THOMAS (1954) em peroxidase de rábano, as contribuições prestadas por SMITHIES (1955) com o desenvolvimento da electroforese em gel de amido, e por HUNTER e MARKERT (1957) que demonstraram que as enzimas podiam ser visualizadas directamente nos géis de amido quando revelados com corantes histoquímicos específicos. Ao conjunto dessas bandas dos perfis electroforéticos designaram por zimograma (MCMILLIN, 1983).

Em 1959, surgiu pela primeira vez o termo isoenzima definido por Markert e Moller para designar as múltiplas formas moleculares da mesma enzima com actividades catalíticas idênticas ou semelhantes, detectáveis electroforeticamente, presentes no mesmo indivíduo, e demonstraram também que as isoenzimas eram específicas dos tecidos, estágio de desenvolvimento e das espécies.

2.2. Ocorrência e localização das isoenzimas

As múltiplas formas moleculares de uma enzima têm origem na ocorrência de vários mecanismos, como provam os trabalhos de MARKERT e WHITT (1968), MARKERT *et al.* (1975) e WEEDEN (1983), e, basicamente, podem-se considerar como modificações ocorridas durante e após a síntese da enzima (SHAW, 1969).

No primeiro caso, surgem as modificações a nível do DNA, nomeadamente as mutações responsáveis pela substituição de um aminoácido, as mutações que conduzem à substituição de vários aminoácidos por inserção ou deleção de fragmentos de DNA, a duplicação parcial ou total de um gene enzimático com subsequente divergência do original, e as modificações que ocorrem durante os processos de transcrição e tradução.

No segundo caso, o polimorfismo isoenzimático pós-síntese deve-se a modificações pós-translacionais nas proteínas da célula viva, que originam as isoenzimas conformacionais, resultantes principalmente da clivagem da cadeia polipeptídica ou ligação a diversos constituintes, e as isoenzimas agregacionais resultantes da agregação das cadeias polipeptídicas em formas multiméricas, ambas possuindo genes estruturais idênticos (WEEDEN, 1983).

O desenvolvimento de um organismo, do embrião ao estado adulto, é acompanhado pela expressão diferencial de enzimas necessárias aos mecanismos bioquímicos em diferentes tipos de células, tecidos e órgãos.

Essas actividades metabólicas são semelhantes e, conseqüentemente, as enzimas que catalisam reacções idênticas podem ser encontradas em muitos organismos diferentes e em diferentes tecidos dentro dum organismo. Cada tecido tem o seu próprio e característico perfil de isoenzimas que varia durante o desenvolvimento embrionário até ser atingida a configuração adulta.

Assim sendo, as isoenzimas podem ser encontradas no mesmo compartimento subcelular, em diferentes compartimentos da célula, em diferentes células ou tecidos do organismo, ou podem ser produzidas em diferentes estádios de desenvolvimento (FERET e BERGMANN, 1976; WEEDEN, 1983).

Os tecidos embrionários podem possuir mais ou menos isoenzimas do que os correspondentes tecidos adultos, e as proporções relativas das isoenzimas

também variam de acordo com o estágio de desenvolvimento (MARKERT e MOLLER, 1959). Esta especificidade do perfil isoenzimático pode basear-se em populações de diferentes espécies de células, em que cada célula simples pode produzir só uma simples isoenzima ou alternativamente várias isoenzimas.

2.3. Vantagens e limitações da aplicabilidade das isoenzimas

Diversos autores referem que à medida que o nível de observação se aproxima do material genético aumenta a probabilidade de se encontrar crescente variabilidade. Sendo as isoenzimas, na hierarquia da biossíntese, muito próximas dos genes não é de estranhar maior variabilidade entre elas do que a que se encontra ao nível de outros marcadores, oferecendo-nos por isso algumas vantagens em relação aos caracteres morfológicos.

Os marcadores morfológicos sofrem muitas vezes efeitos epistáticos e/ou pleiotrópicos limitando o número de marcadores em segregação, interação de forma dominante/recessiva, obrigando à observação das descendências para distinguir os diferentes genótipos, e estão mais sujeitos à acção directa e variável da selecção natural (MOORE e COLLINS, 1983).

Contrariamente, os marcadores bioquímicos, como as isoenzimas, estão sob o controlo genético de alelos codominantes, o que permite distinguir indivíduos homocigóticos dos heterocigóticos em qualquer geração em segregação. Além disso, raramente exibem interações epistáticas e efeitos pleiotrópicos, permitindo a observação de um número ilimitado de loci e o processo de os analisar é acessível, rápido e não destrutivo uma vez que podem ser identificados em pequenas quantidades de uma variedade de tecidos.

Diversos autores consideram que a principal vantagem reside fundamentalmente no facto de os constituintes das enzimas, os polipéptidos, serem os produtos primários dos genes no DNA, e, conseqüentemente, transportarem o código genético. Como a sequência nucleotídica de um gene é colinear com a sequência de aminoácidos no polipéptido, qualquer variação do código genético nesse gene origina, em muitos casos, uma variação na sequência de aminoácidos do polipéptido, que, se modificar a carga ou a conformação das moléculas enzimáticas, pode ser detectada através de técnicas electroforéticas.

Consequentemente, as isoenzimas permitem detectar diferenças genéticas tão próximo quanto possível do nível do DNA, são minimamente afectadas pelas condições ambientais e os seus perfis são fielmente reprodutíveis (ADAMS, 1983; BAILEY, 1983; PEIRCE e BREWBAKER, 1973).

Nesta base, as isoenzimas comportam-se como características genéticas, e, portanto, são adoptadas como marcadores genéticos, permitindo a observação da variação alélica para um determinado loci estrutural e, consequentemente, a estimativa da variação genética em populações e espécies (BERGMAN, 1991).

Apesar das vantagens referidas existem várias limitações que restringem a sua aplicabilidade.

Em primeiro lugar, a identificação dos loci enzimáticos através dos zimogramas não abrange todos os loci genéticos estruturais presentes no genoma da espécie, e esta falta de representatividade pode influenciar a determinação da diversidade genética e da heterozigocidade.

Em segundo lugar, apenas uma determinada proporção de substituições nucleotídicas no DNA origina substituições de aminoácidos capazes de alterar a mobilidade electroforética dos polipéptidos. Cerca de 30% das substituições resultam em diferenças de carga detectáveis por electroforese convencional, enquanto outras 20-30% de substituições resultam em alterações conformacionais apenas detectáveis por técnicas mais sensíveis, tais como focagem isoeléctrica ou electroforese de gradiente (LEWONTIN, 1973).

Além disso, uma banda isoenzimática simples revelada num zimograma pode, muitas vezes, esconder bandas de idêntica mobilidade, de tal modo que os métodos electroforéticos tendem a subestimar o nível de variação alélica de um loci polimórfico (BERGMANN, 1991).

2.4. Visualização e interpretação das isoenzimas

Para que as isoenzimas constituam um instrumento rigoroso em estudos genéticos, é necessário promover um cuidado e eficiente desenvolvimento teórico e experimental, atendendo sempre a duas considerações interdependentes: a selecção da metodologia electroforética e a interpretação genética (WENDEL e WEEDEN, 1989).

O método adoptado para a análise de isoenzimas é a electroforese, que assenta no princípio da mobilidade diferencial de macromoléculas em solução, num determinado suporte e quando submetidas à acção de um campo eléctrico (DUNBAR, 1987).

É uma técnica analítica que permite a discriminação não destrutiva de um grande número de indivíduos num curto espaço de tempo, o equipamento é acessível, e fundamentalmente permite equacionar directamente a variação nos perfis electroforéticos com a variação no gene que codifica as várias enzimas.

Como qualquer técnica analítica, também apresenta alguns inconvenientes, pois não permite obter informações sobre o número de aminoácidos ou de mutações que originam as alterações nas mobilidades electroforéticas, conforme o número de genes que codificam diferentes formas moleculares.

A mobilidade electroforética depende da massa molar, da estrutura e da carga eléctrica das moléculas, que é, por sua vez, função do grau de ionização dos aminoácidos constituintes das proteínas e, conseqüentemente, do pH do meio e depende ainda da quantidade de corrente aplicada e da resistência do meio.

O meio de suporte permite minimizar os efeitos de convecção e difusão durante a electroforese, imobilizar as moléculas separadas nas suas posições finais e evitar a perda de resolução.

São vários os meios de suporte electroforéticos disponíveis, incluindo papel, acetato de celulose, géis de agarose, amido e poliacrilamida, permitindo estes dois últimos uma melhor resolução e visualização das bandas isoenzimáticas.

O gel de poliacrilamida usado a partir da década de 60, é uma matriz com uma estrutura tridimensional permeável ao tampão e à passagem das moléculas

proteicas através dos seus retículos. A principal característica deste gel, que torna atractiva a eleição deste meio, é a possibilidade de seleccionar a dimensão mais conveniente dos retículos para a separação das moléculas em estudo, comportando-se como um “crivo molecular” (CHARAMBACH e RODBARD, 1971; HAMES, 1990).

Apresenta ainda outras vantagens, como ser quimicamente inerte, estável numa longa gama de pH, temperatura e força iónica, e ser transparente. O grande inconveniente no seu uso é a sua toxicidade, por ser um produto neurotóxico.

O gel de poliacrilamida é formado por polimerização dos monómeros acrilamida e N,N'- metileno-bisacrilamida, por uma reacção em cadeia iniciada por radicais livres, normalmente por uma mistura de persulfato de amónio e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED). O persulfato de amónio activa o TEMED deixando-o com um electrão desemparelhado. Este radical reage então com a molécula de acrilamida para produzir um novo radical, que, por sua vez, vai reagir com outra molécula de acrilamida, construindo-se assim um polímero.

Ocasionalmente, as moléculas de N,N'-metileno-bisacrilamida vão-se incorporando no polímero formando um complexo emaranhado de cadeias poliméricas ligadas umas às outras em vários pontos, deixando espaços reticulares, que permitem a passagem dos electrólitos durante a electroforese.

A dimensão média desses retículos varia de acordo com a concentração total da acrilamida na mistura de polimerização e também com a razão acrilamida/ bisacrilamida, e, por isso, a composição do gel de poliacrilamida é normalmente descrita por dois parâmetros, %T que representa a concentração total do monómero usada para produzir o gel em gramas por 100 ml, e %C que é a percentagem em peso do monómero de ligação (ANDREWS, 1986).

2.5. Preparação da amostra

A electroforese pode ser realizada em extractos de uma grande variedade de tecidos vegetais, como, por exemplo, folhas jovens metabolicamente activas, caules, extremidades das raízes, plântulas, várias partes das sementes ou ainda pólen, dependendo a escolha de algumas variáveis que devem ser optimizadas para cada estudo (WENDEL e WEEDEN, 1989).

As principais são a acessibilidade e disponibilidade do material, e, como os fenótipos isoenzimáticos variam com os diferentes tecidos vegetais e podem ser influenciados pelo estado fisiológico e ambiental, originando a presença ou ausência de bandas e/ou variações na intensidade das mesmas, é importante assegurar as mesmas condições fisiológicas e ontogenéticas para as diferentes amostras.

Os tecidos escolhidos para análise electroforética são, normalmente, preparados como extractos em soluções tampão, por maceração, sem etapas elaboradas de purificação ou concentração, e cada tecido apresenta um conjunto de problemas relativamente à dificuldade de ruptura das células e à presença de taninos, fenóis, fenoloxidasas e outros constituintes celulares geralmente não identificados, que estão rigidamente compartimentados *in vivo* (FERET e BERGMANN, 1976).

Seja qual for o processo de maceração, e para que não ocorra perda de actividade enzimática, a ruptura das células deve ser efectuada num período de tempo mínimo e sem aquecimento do extracto, com o volume de solução tampão de extracção necessário para se obter suficiente extracto para a electroforese e suficiente tamponização, completa complexação dos compostos fenólicos e remoção de outros interferentes. Após a homogeneização, os extractos podem ainda ser centrifugados para remoção de resíduos celulares, originando zimogramas com maior resolução.

De grande importância também é o tipo de solução tampão utilizada na preparação do extracto, operação que requer cuidados especiais. A escolha depende das concentrações de compostos fenólicos e outras substâncias interferentes presentes nas células dos tecidos vegetais, que complexam com as enzimas após a ruptura celular, e provocam a perda ou redução de actividade enzimática e/ou a produção de artefactos (ANDERSON, 1968; LOOMIS e BATTAILE, 1966).

Basicamente, são três os mecanismos de interacção dos compostos fenólicos com as moléculas proteicas (ANDERSON, 1968; LOOMIS e BATTAILE, 1966; GOLDSTEIN e SWAIN, 1965):

- (1) - Formação de ligações reversíveis entre os grupos hidroxilo dos fenóis e o grupo carboxilo das proteínas originando compostos insolúveis;

- (2) - Oxidação dos compostos fenólicos com formação de quinonas, compostos altamente reactivos, que por sua vez podem oxidar grupos sulfidrilo, amino e imino das proteínas, com formação de ligações covalentes originando pigmentos castanhos responsáveis pela inibição da actividade enzimática. A oxidação dos fenóis pode ocorrer por via não enzimática ou por via enzimática catalisada pelas enzimas fenoloxidase e peroxidase, que estão presentes nos tecidos vegetais;
- (3) - Formação de ligações iónicas entre o ião fenolato e os centros activos catiónicos das enzimas, provocando a desnaturação das proteínas.

Para evitar a formação e acumulação dos produtos resultantes da interacção dos compostos fenólicos com as moléculas proteicas e prevenir a perda de actividade enzimática, recorre-se à utilização de compostos protectores, que actuam nos diferentes mecanismos por:

- Remoção dos compostos fenólicos mediante a formação de complexos insolúveis usando a polivinilpirrolidona (PVP) solúvel ou insolúvel;
- Inibição da formação de complexos compostos fenólicos-moléculas proteicas, recorrendo ao uso de produtos como o polietilenoglicol (PEG) e o mono-oleato de sorbitol (TWEEN 80);
- Inibição da actividade da polifenoloxidase, a enzima mais responsável pela oxidação dos compostos fenólicos (SHEEN e CALVERT, 1969), através da utilização de agentes quelatizantes do cobre, como, por exemplo, o dietilditiocarbamato (DIECA) e o 2-mercaptoetanol (ME);
- Remoção das quinonas por redução a difenóis utilizando o tioglicolato de sódio, o ascorbato de sódio e o ácido ascórbico, ou por condensação com outro composto que não sofra oxidação e que não é inibidor;
- Inibição da desnaturação das proteínas em soluções aquosas, utilizando a sacarose e o glicerol.

Apesar da grande diversidade de aditivos disponíveis para melhorar a qualidade dos extractos é difícil prognosticar a sua eficiência, sem o prévio conhecimento da actividade da o-difenol-oxidase, a sua localização celular, a natureza e teor dos compostos fenólicos presentes nos tecidos, o mecanismo de acção da o-difenol-oxidase e os mecanismos de acção dos vários aditivos.

Na ausência destas informações, ainda muito limitadas no reino vegetal, o caminho a seguir é a comparação de vários métodos de extracção, testando a eficiência de vários protectores para um caso concreto (ANDERSON, 1968).

2.5.1. Material vegetal

A electroforese pode ser aplicada em extractos de uma grande variedade de tecidos vegetais, tais como folhas, raízes, sementes, pólen, dependendo muitas vezes a escolha do material da sua disponibilidade.

As folhas são o material vegetal mais utilizado, fundamentalmente por essa disponibilidade e por conterem grande actividade enzimática, o que permite a realização de ensaios durante vários estádios de vida da planta e durante todo ou grande parte do ano.

Todavia, o seu uso tem limitações, por estarem sujeitas a variações fisiológicas durante um período de tempo que podem afectar os fenótipos isoenzimáticos, tornando-se necessário amostrar sempre a mesma folha sob as mesmas condições fisiológicas e ontogénicas. Refere EIRAS-DIAS (1994), que os perfis isoenzimáticos dos sistemas aspartato aminotransferase (EC.2.6.1.1), α,β -carboxilesterases (EC.3.1.1.1) e fosfatase ácida (EC.3.1.3.2), apresentam variações ao longo do ciclo vegetativo da videira, e que a actividade isoenzimática cessa com a paragem de crescimento das folhas. Para obter folhas jovens em condições ambientais constantes e em fases do ciclo vegetativo bem determinadas recorreu o autor a uma câmara de ambiente controlado. Outra grande limitação, é a presença de compostos fenólicos e outras substâncias que interferem com a actividade enzimática, sendo necessário recorrer a processos de extracção mais elaborados (KELLEY e ADAMS, 1977; BOUSQUET e LALONDE, 1991).

Depois da folha, o pólen é o material vegetal mais utilizado por ser uma fonte rica de enzimas para metabolizar os substratos externos e internos essenciais para o crescimento do tubo polínico, é um tecido não clorofílico (MÄKINEN e MACDONALD, 1968; BREWBAKER, 1971; WENDEL e WEEDEN, 1989), e alguns autores consideram-no vantajoso em relação ao material esporófito.

É um material praticamente livre de compostos fenólicos o que supõe uma maior simplicidade na obtenção dos extractos enzimáticos e os perfis electroforéticos são estáveis e facilmente se podem conservar no frio durante longos períodos de tempo (MÄKINEN e BREWBAKER, 1967). Além disso, as

diferenças isoenzimáticas, devidas ao estado ontogenético ou fisiológico, podem ser eliminadas ou muito reduzidas, e por ser haplóide, os zimogramas são mais simples e, conseqüentemente, de mais fácil interpretação, permitindo realizar análises de paternidade e estudos do movimento de genes entre populações (ROSEN, 1968).

Em relação a outros materiais vegetais tem o inconveniente de apenas se dispôr de pólen durante um escasso período de tempo.

As enzimas no pólen estão associadas principalmente às paredes dos grãos de pólen, nomeadamente com a intina na sua camada celulósica interna especialmente à volta dos poros que marcam os sítios de emergência dos tubos polínicos (VASIL, 1973; MÄKINEN e BREWBAKER, 1967) e também nas esculturas da exina (KNOX e HESLOP-HARRISON, 1970, 1971).

A solidez e resistência da parede do grão de pólen à erosão e produtos químicos conduziu à opinião comum que o material vivo do microgametófito, encerrado no grão de pólen maduro, não tinha contacto com o ambiente. Contradizendo esta opinião, vários autores (KNOX e HESLOP-HARRISON, 1969, 1971a, 1971b, 1971c, 1973) referem que o grão de pólen seco quando hidratado liberta rapidamente muitas isoenzimas (MASCARENHAS, 1975).

KNOX e HESLOP-HARRISON (1970) demonstraram a presença, através de métodos citoquímicos, de várias enzimas, como a fosfatase ácida, esterase, amilase e protease, nas paredes de 50 diferentes pólenes de angiospérmicas. Em todos os casos essa actividade enzimática estava associada principalmente à intina, e concentrada à volta dos sítios de emergência dos tubos polínicos, o que prova que a especificidade das enzimas do pólen está provavelmente relacionada com os tecidos nos quais os tubos normalmente crescem.

As enzimas detectadas no pólen variam com as espécies, com os métodos de extracção e armazenamento e durante o seu desenvolvimento. Durante a microsporogénese, ou seja o desenvolvimento do gametófito masculino, as enzimas mais activas são as relacionadas com a replicação do DNA, a síntese do RNA e o desenvolvimento da exina e intina. Outras, relacionadas com o crescimento inicial do tubo no tecido feminino, são activas ou facilmente activadas no microsporo maduro (STANLEY e LINSKENS, 1974).

2.6. Detecção da actividade enzimática

A actividade enzimática e a própria indicação das bandas individuais com actividades catalíticas, após a realização da electroforese, são detectadas *in situ* através de reacções de coloração específicas, tais como a formação de um produto corado e insolúvel, a observação de variações nas propriedades ópticas, a absorção ou fluorescência do substracto ou do produto, transferência do gel para uma membrana, ou por copolimerização do substracto no gel de separação (GABRIEL e GERSTEN, 1992; PASTEUR *et al.*, 1988).

As enzimas estudadas pela combinação da electroforese convencional e dos processos de coloração histoquímicos podem classificar-se em dois grandes grupos: específicas e não específicas, embora esta distinção seja operacional e não muito significativa. As enzimas não específicas são reveladas utilizando compostos sintéticos, como substratos que são alterados pela acção da enzima que produz uma variação visível da cor. Para detectar a presença das enzimas específicas utilizam-se substratos específicos, que ao sofrerem redução tornam-se corados e relativamente insolúveis em solução aquosa (SHAW, 1965).

O número de bandas que aparecem nos perfis isoenzimáticos é função da estrutura quaternária da enzima, do número de loci que codificam a enzima, do número de alelos por locus e do grau de ploidia do indivíduo. Os perfis isoenzimáticos variam grandemente em complexidade, dependendo de numerosos factores, nomeadamente do tipo de organismo e tecido bem como da enzima em análise (WENDEL e WEEDEN, 1989; TORRES *et al.*, 1978).

Quando uma determinada banda aparece na mesma posição no gel em todos os indivíduos analisados, ou seja não existe variação, diz-se monomórfica, em oposição às que estão presentes nuns indivíduos e ausentes noutros e se referem como polimórficas.

3. Aplicações dos estudos isoenzimáticos

Os polimorfismos isoenzimáticos começaram a ser utilizadas no estudo de espécies florestais a partir do início da década de 70, e ainda hoje continuam a ter um papel importante pela informação e contribuição que fornecem como instrumento para a eficácia das estratégias e sucesso na resolução de programas de melhoramento.

São já numerosos os trabalhos publicados sobre estudos através de isoenzimas, e, segundo ADAMS (1983), dependendo do modo como se utiliza a informação fornecida pelos estudos isoenzimáticos, podem definir-se dois grandes domínios de aplicações no melhoramento florestal.

No primeiro domínio de aplicações, as isoenzimas são analisadas como uma amostra representativa da maioria dos genes no genoma, e os resultados obtidos permitem fundamentalmente estimar a variabilidade genética, determinando perfis de diferenciação genética dentro e entre populações, oferecendo informação genética necessária para o delineamento das estratégias de melhoramento e conservação dos recursos genéticos, bem como aferir as variações que ocorrem nas populações devido à selecção e destruição dos ecossistemas.

No outro domínio de aplicações, as isoenzimas, consideradas como marcadores porque são colineares com o gene, servem estritamente para classificar geneticamente indivíduos ou populações, permitindo determinar e manter a identidade de árvores progenitoras e clones, certificar a identidade de lotes de sementes, determinar a validade de cruzamentos controlados, estudar os factores que afectam a eficiência genética dos pomares de sementes e as contaminações por pólen estranho e seleccionar caracteres economicamente favoráveis.

Na caracterização e identificação de espécies vegetais e segundo BAILEY (1983) e SINGH *et al.* (1973), para que se possam utilizar as isoenzimas com sucesso, existem três critérios básicos e essenciais: estabilidade ambiental, isto é, que não haja influência ambiental na expressão dos perfis; variação intervarietal clara, ou seja, que cada variedade tenha os seus perfis isoenzimáticos

característicos e distintos dos revelados por outras variedades em comparação; e variação intravarietal mínima ou nula, isto é que os perfis isoenzimáticos dos indivíduos de uma espécie variem minimamente. Para caracteres bioquímicos deve considerar-se um quarto critério, que é a reprodutibilidade dos resultados laboratoriais, uma vez que se trata de um processo laboratorial.

Recorre-se muitas vezes ao uso das isoenzimas na identificação varietal pela sua aparente estabilidade ambiental. Como já foi referido, as isoenzimas são proteínas cujas sequências de aminoácidos são transcritas directamente da sequência nucleotídica do gene. As isoenzimas que diferem significativamente na composição de aminoácidos terão cargas iónicas, formas e dimensões moleculares diferentes. Na presença de um campo eléctrico num gel de poliacrilamida, essas diferenças obrigam que as diferentes formas migrem a diferentes velocidades, não só pelo acção da diferença de potencial mas também pelo efeito de crivagem molecular resultante da estrutura do gel, originando idealmente uma banda distinta por cada forma isoenzimática, e todas elas em conjunto constituindo o zimograma.

Sob condições laboratoriais normalizadas, todas as isoenzimas terão igual oportunidade para experimentar modificações conformacionais pelo ambiente químico, por exemplo, concentração, temperatura, interações iónicas, etc. Então, qualquer variação consistente do perfil isoenzimático entre zimogramas é atribuível a diferenças genotípicas entre os indivíduos sob comparação.

Sendo as isoenzimas produtos quase directos dos genes, as condições ambientais não têm possibilidade de afectar a composição e sequência dos aminoácidos da enzima, embora possam afectar a actividade do gene e determinar se, como, quando e em que quantidade essa enzima é produzida no tecido escolhido para análise (WERNER e SINK, 1977; MCCOWN *et al.*, 1969).

SHANNON (1968) e outros investigadores demonstraram também que as doenças, danos mecânicos e agentes poluentes do ar podem afectar igualmente a actividade génica (BAILEY, 1983).

Contudo, muitos outros autores, que têm ensaiado a estabilidade ambiental, demonstraram que se as análises forem realizadas em condições o mais homogéneas possível, sobretudo em relação ao tipo e idade do tecido analisado, a instabilidade pode ser desprezada, não representando uma limitação a estudos de caracterização e identificação varietal.

A ocorrência de fenótipos isoenzimáticos diferentes em variedades da mesma espécie representa a variação intervarietal, que pode ser qualitativa quando uma determinada banda da isoenzima, referida pela sua mobilidade de migração (R_f), está presente num zimograma de uma variedade e ausente noutra de uma variedade idêntica, ou quantitativa quando uma determinada banda está presente nos zimogramas de duas variedades da mesma espécie, mas difere na intensidade de coloração. A variação intervarietal quantitativa não permite detectar diferenças mínimas, como a variação qualitativa, pelo que a sua utilização se torna de interesse reduzido.

A variação intravarietal é representada pela ocorrência de fenótipos isoenzimáticos diferentes entre indivíduos pertencentes à mesma variedade, e serve como medida da uniformidade e estabilidade do fenótipo isoenzimático dentro da variedade. Estudos experimentais realizados por HAMRICK *et al.* (1979) em 110 espécies vegetais, e por LUMARET *et al.* (1991) em *Quercus ilex*, mostram que as espécies alogâmicas possuem uma grande variação genética intravarietal.

Os perfis isoenzimáticos podem ser afectados por modificações do processo de extracção e da separação electroforética (composição das soluções tampão e pH, porosidade do gel, tipo de gel, voltagem, temperatura), do processo de coloração (substrato da enzima, concentração do corante e da temperatura de revelação), e ainda das condições da colheita (tipo de tecido, idade fisiológica do material vegetal, temperatura, humidade).

A fim de assegurar a reprodutibilidade dos resultados laboratoriais, cada um destes factores deve ser considerado como uma fonte de variabilidade, e torna-se necessário efectuar estudos preliminares para determinar qual a melhor combinação de todos os factores para a optimização da separação isoenzimática, e normalizar o processo.

4. Estimativa da variabilidade genética de populações de espécies florestais

A maioria das espécies biológicas apresentam-se, normalmente, divididas em comunidades de indivíduos, as populações, que compartilham de uma carga genética comum.

Nas espécies vegetais, o sistema de cruzamento (autogamia, alogamia ou sistema misto), o sistema reprodutivo (polinização por insectos, por aves ou pelo vento), a selecção natural, o mecanismo de dispersão da semente, a distribuição geográfica, são alguns dos factores mais importantes que contribuem para acentuar a variabilidade genética e, conseqüentemente, a divisão da espécie em populações geneticamente diferenciadas (MÜLLER-STARCK *et al.*, 1992; MORAN, 1992).

O estudo da variabilidade genética em populações teve início no princípio do século, progredindo substancialmente nas duas últimas décadas devido ao avanço técnico da genética molecular que utiliza métodos cada vez mais sensíveis na detecção da variabilidade.

A análise electroforética da variação enzimática, propicia uma eficiente estimativa da variação genética dentro das populações e da extensão da divergência genética entre populações, uma vez que as enzimas são altamente informativas do ponto de vista genético dos organismos e das suas alterações evolutivas, por serem a expressão quase directa dos genes.

De facto, as diferenças nas mobilidades electroforéticas das isoenzimas significam diferenças na sua estrutura primária, ou seja, na sequência dos seus aminoácidos. Sendo esta sequência colinear com a sequência nucleotídica dos respectivos genes, ao analisarmos a variação isoenzimática estamos a analisar a variação genética. É precisamente esta simples relação que faz da análise isoenzimática um consistente método analítico para medir a variação genética.

Na análise de estudos publicados sobre a variação genética em espécies florestais, deparamo-nos com duas dificuldades.

A primeira relacionada com os métodos de estimativa da variação genética, que são vários e diferem entre estudos tornando difícil a comparação

dos resultados, e também o uso de diferentes conceitos e definições especialmente para os termos diversidade e heterozigocidade. NEI (1973) refere que a palavra heterozigocidade não é a mais apropriada se se tratar de uma população onde não se verifique cruzamento casual, razão por que prefere denominá-la diversidade genética.

A heterozigocidade é inteiramente baseada nas frequências alélicas da população e independente da frequência dos indivíduos heterozigóticos, não entrando em linha de conta com os efeitos de cruzamento não casual ou de selecção.

A segunda dificuldade deve-se à omissão nessas comunicações das frequências alélicas e/ou genótípicas não permitindo uma reanálise dos dados originais, não se referindo também se os loci monomórficos são ou não excluídos nos métodos que utilizam.

4.1. Variabilidade genética intravarietal

A organização da variabilidade genética dentro das populações tem a função de permitir a adaptação imediata e a flexibilidade dos indivíduos para as necessidades futuras.

Dos vários parâmetros referidos na bibliografia, os mais comumente utilizados para estimar a variabilidade genética dentro das populações baseiam-se na frequência alélica de cada locus da população, e para descrever o grau dessa variabilidade podem ser considerados, basicamente, os seguintes parâmetros (MORAN, 1992; HAMRICK *et al.*, 1992):

P - proporção de loci polimórficos por população

A - número médio de alelos por locus

H - diversidade génica

A percentagem de loci polimórficos dá-nos uma indicação grosseira do nível de variação genética numa amostra, e podem considerar-se dois critérios. Num deles, um locus é considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais frequente é inferior ou igual a 0,95; num outro, um locus é ainda considerado polimórfico desde que a frequência do alelo mais comum não

exceda 0,99. Este parâmetro depende do tamanho da amostra e do número e espécie de enzimas analisadas (BROWN e WEIR, 1983; EL-KASSABY, 1991).

O número médio de alelos por locus tem o mérito de salientar uma das componentes da diversidade genética que é a riqueza alélica, mas inversamente considera todos os alelos independentes sem levar em conta a sua distribuição e importância biológica, e depende também do tamanho da amostra (BROWN e WEIR, 1983).

A heterozigocidade média, baseada inteiramente nas frequências alélicas da população, representa a variabilidade real em relação a todos os loci analisados, e é referida por HUBBY e LEWONTIN (1966) simplesmente por heterozigocidade, por MARSHALL e JAIN (1969) como índice de polimorfismo e por NEI (1973) designada por diversidade génica. Contrariamente aos parâmetros anteriores é relativamente independente do tamanho da amostra.

Nas angiospérmicas o estudo da variabilidade genética está ainda pobremente documentado, sobretudo devido a vários problemas metodológicos, principalmente a utilização de tecidos vegetais pela presença do alto teor em compostos fenólicos.

A fim de quantificar o nível de polimorfismo intrapopulacional para melhor conhecermos o grau de uniformidade e estabilidade existente na população, calcula-se para cada sistema enzimático os respectivos índices de polimorfismo (PI), através da expressão descrita por MARSHALL e ALLARD (1970), SINGH *et al.* (1973) e BROWN (1978):

$$PI = \left(\sum_{i=1}^N p_i q_i \right) / N$$

onde p_i é a frequência do alelo i^o , $q_i = (1 - p_i)$, e N o número total de bandas consideradas.

O valor do índice de polimorfismo, que é essencialmente uma medida da diversidade alélica, pode variar de 0 a 0,25, tem em consideração as diferenças na proporção de bandas polimórficas e monomórficas e ainda o grau de polimorfismo para cada uma das bandas (MARSHALL e ALLARD, 1970).

Em vários trabalhos publicados sobre a estimativa dos níveis de variação intrapopulacional, embora cada referência tenha utilizado critérios de estudo diferentes, as conclusões gerais são semelhantes para as espécies vegetais, que

mantêm, geralmente, níveis relativamente elevados de variação dentro das populações.

HAMRICK (1989), no estudo realizado em 100 espécies encontrou para a média, em espécies vegetais, 37% de loci polimórficos, 1,69 para o número de alelos por locus e 0,141 para a heterozigocidade por indivíduo. Verificou ainda a existência de uma considerável heterogeneidade entre as espécies dentro da população, e concluiu que uma proporção significativa desta variação estava associada com as características ecológicas e história da vida das espécies, especialmente com o longo período de vida, a grande distribuição geográfica, a fecundação cruzada e a dispersão do pólen.

Durante o seu longo período de vida, as espécies florestais experimentam diferentes situações climáticas que as podem afectar de diferente modo e grau, impondo-lhes uma determinada selecção que origina uma maior variação genética.

De igual modo, o sistema de cruzamento de cada espécie, que determina a distribuição das frequências genotípicas, tem um efeito marcante na constituição genética das populações.

A reprodução por autofecundação aumenta a probabilidade de fixação ou perda de alelos, originando populações autogâmicas compostas, preferencialmente, por indivíduos homozigóticos para a maioria dos seus loci, mostrando, frequentemente, menor variabilidade genética dentro das populações que as espécies de fecundação cruzada.

A dispersão do pólen tem também importantes implicações na estrutura genética das populações. A extensão dessa dispersão influencia não só a diversidade genética dentro das populações e o tamanho efectivo da população, mas também o grau em que essas populações se tornam geneticamente subdivididas.

Para a maioria das árvores florestais o conhecimento da estrutura genética é escasso, bem como a compreensão da dinâmica biológica da variação genética dentro e entre espécies, informações que são necessárias para desenvolver métodos reais e efectivos de amostragem da diversidade genética total de populações.

5. Material e Métodos

5.1. Material

De todas as indústrias corticeiras existentes no País, a principal e com grande incidência na exportação, é sem dúvida a transformadora - produtora de artefactos por simples corte de prancha (rolhas, discos, etc.), que exige a maior homogeneidade e o mínimo de porosidade do material.

Na porosidade da cortiça, entendida como a área ocupada pelos canais lenticulares, interfere o número de lentículas numa dada superfície, e ainda com maior profundidade as suas dimensões. Por isso, o arranjo lenticular tem um interesse muito especial e uma influência decisiva na qualidade da cortiça.

Refere NATIVIDADE (1950), que o arranjo lenticular parece estar, fundamentalmente, sob controle genético, e influenciado, dentro de certos limites, pelas condições ambientais, que interferem na intensidade de crescimento da árvore, modificando o tamanho das lentículas e, conseqüentemente, originando canais lenticulares de diferentes diâmetros.

Igualmente importante e com conseqüências nalgumas propriedades da cortiça, como a dureza e a densidade, é a sua espessura. Cortiças resultantes de um rápido crescimento e, portanto, com maiores espessuras são menos densas do que as cortiças mais delgadas.

No âmbito do projecto comunitário “Melhoramento da Qualidade e Produtividade do Ecosistema do Sobreiro”, foram identificadas e seleccionadas árvores adultas (DAP > 90 cm), produtoras de cortiça amadia, em parcelas com 2000 m², implantadas sobre a Carta de Distribuição do Sobreiro em Portugal.

A eleição das árvores foi feita, fundamentalmente, em função da qualidade da cortiça produzida, considerando os aspectos estruturais observáveis e quantificáveis, e as características determinantes da qualidade: espessura, densidade e defeitos acidentais.

A caracterização da cortiça nos seus aspectos qualitativos e quantitativos foi feita de acordo com as normas em uso e tendo em consideração os aspectos estruturais e quantificáveis nas três superfícies visíveis nas pranchas e provetes (barriga, massa e costa) (CARVALHO, 1992). A classificação e ordenamento qualitativo dos diferentes sobreiros foram efectuados mediante um critério de pontuação ponderada (anexo I) e de acordo com um referencial ou peso quanto à maior ou menor importância dos caracteres, não só quanto à forma da superfície geradora de cortiça ou ao hábito da árvore que a potencializou com maior potencial produtivo mas também na perspectiva da principal função a ser exercida pela cortiça no engarrafamento.

Para a realização deste estudo, e, fundamentalmente, por já ser conhecida a caracterização morfológica da cortiça de algumas árvores já inventariadas, parâmetros necessários para o desenvolvimento dos objectivos propostos, seleccionámos alguns desses exemplares, tendo ainda em consideração que a maior mancha de montado do País se concentra na bacia terciária do rio Tejo, que engloba 68% da área de montado de sobreiro nas províncias do Alentejo e Ribatejo.

A amostra sobre a qual incidiu o estudo incluiu 69 árvores, que durante o período de realização deste trabalho produziram pólen, material optado como a nossa fonte enzimática pelas razões que apresentaremos no ponto 5.3., localizadas nas parcelas instaladas nos Concelhos de Ponte de Sôr, Chamusca, Coruche, Mora, Vendas Novas, Sousel, Alcacer do Sal, Grândola e Arraiolos, assinaladas no mapa representado na Figura 2.

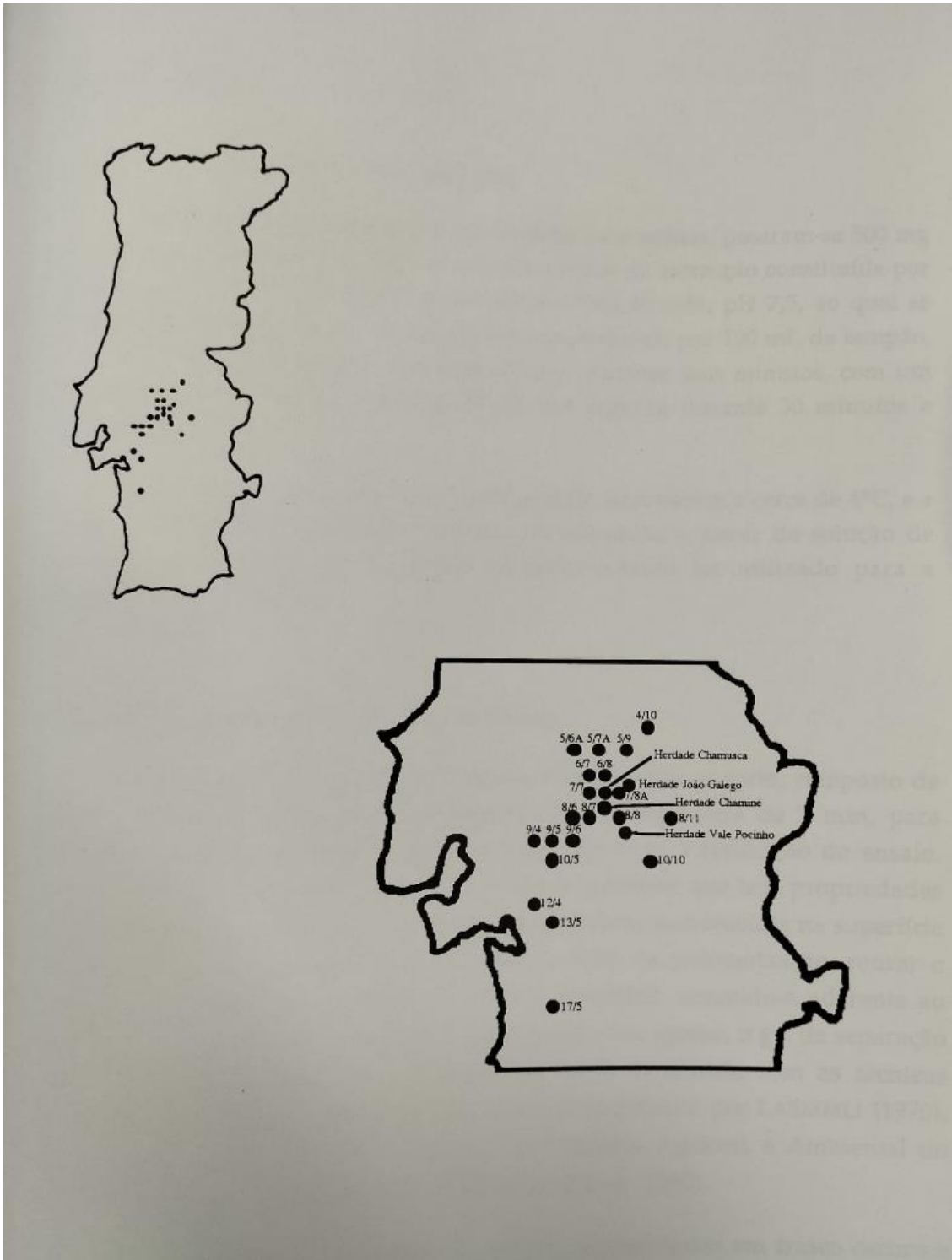


Fig. 2 - Mapa da localização das parcelas analisadas

5.2. Métodos

5.2.1. Extracção das isoenzimas do pólen

Na preparação dos extractos enzimáticos para análise, pesaram-se 500 mg de pólen e adicionaram-se 2 mL da solução tampão de extracção constituída por um tampão Tris (hidroximetil)-aminometano/HCl 50 mM, pH 7,5, ao qual se adicionou 5 g de sacarose e 0,1 mL de 2-mercaptoetanol, por 100 mL de tampão, e procedeu-se à maceração e homogeneização, durante dois minutos, com um triturador Ultra-Turrax, centrifugando-se em seguida durante 30 minutos a 15000 rpm.

As operações de maceração e centrifugação decorreram a cerca de 4°C, e a solução tampão foi preparada na altura da utilização a partir de solução de reserva armazenada no frigorífico. O sobrenadante foi utilizado para a separação electroforética.

5.2.2. Electroforese em gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado num molde próprio, composto de dois vidros separados por um espaçador com a espessura de 2 mm, para permitir um fácil manuseamento do gel durante toda a realização do ensaio, sobre um dos vidros utilizou-se uma folha de poliéster que tem propriedades diferentes em cada uma das superfícies. Propriedades hidrofóbicas na superfície de contacto com o vidro, o que permite, no final da polimerização, retirar o vidro, e propriedades hidrofílicas na outra superfície tornando-a aderente ao gel. Neste molde, fixado através de pinças, utilizou-se apenas o gel de separação com uma concentração em acrilamida de 7,5%, de acordo com as técnicas descritas por ORNSTEIN (1964), DAVIS (1964) e modificada por LAEMMLI (1970), que nos foi cedida pelo Departamento de Química Agrícola e Ambiental do Instituto Superior de Agronomia (BRUNO DE SOUSA, 1983).

A composição das soluções de reserva, armazenadas em frasco escuro e no frigorífico, excepto a solução de persulfato de amónio que deve ser preparada no momento de utilização, está descrita no quadro 1, e a mistura para o gel é constituída por 12 mL da solução A, 7,5 mL da solução B, 30 mL da solução C e 10,5 mL de água destilada.

Quadro 1 - Soluções para a preparação do gel

Reagentes	Solução A	Solução B	Solução C
Acrilamida	40 g		
N,N'-metilenobisacrilamida	1,08 g		
N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina		0,4 mL	
Tris (hidroximetil)-aminometano		36,6 g	
Persulfato de amónio			120 mg
Ácido clorídrico		48 mL	
Água destilada	100 mL	100 mL	100 mL

Utilizou-se um sistema horizontal de electroforese e um banho termostaticado com refrigeração, e para a migração electroforética utilizou-se uma diluição a 11% de um tampão tris/glicina a pH 8,3, constituída por 6 g de Tris (hidroximetil)-aminometano, 28,8 g de glicina para 1 L de água destilada.

Cada gel permite a migração de 50 µL de extracto de 7 amostras com três repetições, e o tempo de duração de cada migração foi de 3 horas, com uma voltagem constante de 450V. No final de cada migração, procedeu-se de imediato à revelação das enzimas, conforme descrito no anexo IV.

5.2.3. Métodos de taxonomia numérica para análise dos dados

A análise dos dados foi feita recorrendo a métodos de taxonomia numérica (Fig. 3 e Fig. 4), seguindo-se uma estratégia diferente para o tratamento dos dados electroforéticos dos 6 sistemas enzimáticos (dados qualitativos) e para as características morfológicas da cortiça (dados quantitativos).

5.2.3.1. Análise dos dados electroforéticos

No caso dos dados electroforéticos obtidos para os seis sistemas isoenzimáticos, elaborou-se previamente a matriz de dados, dispondo em linhas (OTUs) as 69 árvores analisadas, e em 55 colunas as bandas isoenzimáticas polimórficas, indicando-se a presença de uma banda com 1 e a ausência com 0

(dados qualitativos). Foram eliminadas as bandas monomórficas (constantes) e a matriz não possuía valores omissos.

Para aquela matriz rectangular, e dos vários coeficientes de associação disponíveis para os diferentes tipos de dados, utilizou-se para o coeficiente de semelhança, para dados qualitativos, o coeficiente de emparelhamento simples que, como refere CARNEIRO (1987), foi introduzido por SOKAL e MICHENER (1958) e utilizado desde então, e que tem em consideração os pares de ocorrência simultânea 11 ou 00 para os dois OTUs considerados.

Posteriormente, dos vários métodos do tipo sequencial, aglomerativo, hierárquico e de não sobreposição, isto é, do tipo designado correntemente por SAHN (SNEATH e SOKAL, 1973), usou-se o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages).

Este método começa por admitir que no conjunto considerado existem tantos grupos quantas as árvores, com as semelhanças já calculadas no passo anterior e que constituem a matriz de semelhanças. Numa primeira fase selecciona os pares de grupos mutuamente mais semelhantes, e considera que cada um desses pares passa a formar um grupo. Em seguida, recalcula de novo as semelhanças entre o grupo e entre estes e os OTUs não agregados, repetindo sucessivamente esta segunda fase, até à última fase que consiste em reunir num só grupo o par a que se chegou na penúltima (CARNEIRO, 1987).

Os resultados assim obtidos são apresentados sob a forma de uma estrutura ramificada, em que os diferentes ramos se relacionam de acordo com os valores das medidas de semelhança ou dissemelhança em que se baseou o método de agregação, e que se designa como fenograma.

Para este fenograma calculou-se o coeficiente de correlação cofenética (SOKAL e ROHLF, 1962) entre a matriz de valores cofenéticos, que exprimem a relação de semelhança entre OTUs implícita no fenograma e a matriz de semelhança (ou dissemelhança). Este coeficiente de correlação cofenética, indica o grau de concordância entre as duas matrizes, permitindo avaliar se o fenograma é uma representação aceitável dos dados originais.

Usou-se ainda outro método de agregação, a árvore de conexão mínima (MST - Minimum Spanning Tree), que consiste em ligar os diferentes OTUs (árvores) por linhas (conexões), resultando uma “rede” de ligação entre elas. A sobreposição desta “rede” às projecções das árvores obtidas pela análise em

coordenadas principais vai permitir-nos uma melhor verificação da agregação e da detecção de distorções em pares de pontos que, estando as suas projecções muito próximas a duas dimensões, estão na realidade afastados se considerarmos um maior número de dimensões.

Para a obtenção da representação gráfica das árvores ao longo de eixos, num número reduzido de dimensões, geralmente duas ou três, preservando o máximo de variabilidade da matriz multidimensional dos dados originais, seleccionou-se o método de ordenação em coordenadas principais. Este método é uma variante da análise em componentes principais, em que as coordenadas de cada OTU, referidas aos eixos principais, se obtêm a partir da matriz de semelhança, e que produz exactamente a mesma configuração da análise em componentes principais, desde que a matriz de dados originais seja constituída por valores contínuos e não possua valores omissos. Pretende-se com este método de ordenação obter uma imagem da distribuição dos pontos representativos das árvores no espaço com o número de dimensões reduzidas, de modo a que a primeira coordenada principal tenha a direcção da maior dispersão dos pontos, a segunda coordenada principal, ortogonal à primeira, a direcção da segunda maior dispersão dos mesmos pontos, e assim sucessivamente.

A figura 3 mostra o fluxograma referente à análise da matriz de dados qualitativos, em que os nomes dos diferentes programas que operam sobre as matrizes são os usados no sistema de programas NTSYS (VER. 1.7) (ROHLF, 1992).

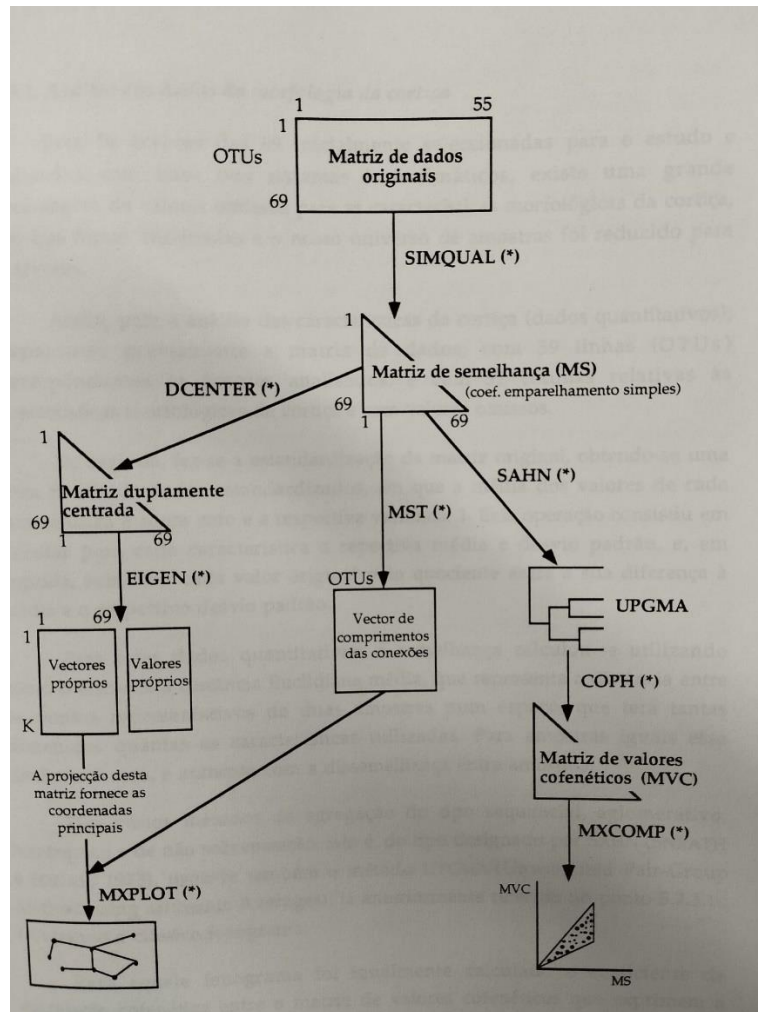


Fig. 3 - Fluxograma para dados qualitativos. (*) Programas que operam sobre as matrizes usadas no sistema de programas NTSYS (VER. 1.7)

5.2.3.2. Análise dos dados da morfologia da cortiça

Para 10 árvores das 69 inicialmente seleccionadas para o estudo e analisadas com base nos sistemas isoenzimáticos, existe uma grande percentagem de valores omissos para as características morfológicas da cortiça, pelo que foram eliminadas e o nosso universo de amostras foi reduzido para 59 árvores.

Assim, para a análise das características da cortiça (dados quantitativos), preparou-se previamente a matriz de dados, com 59 linhas (OTUs)

correspondentes às árvores analisados, e com 32 colunas relativas às características morfológicas da cortiça e sem valores omissos.

De seguida, fez-se a estandardização da matriz original, obtendo-se uma nova matriz de dados estandardizados, em que a média dos valores de cada característica é agora zero e a respectiva variância 1. Esta operação consistiu em calcular para cada característica a respectiva média e desvio padrão, e, em seguida, substituir cada valor original pelo quociente entre a sua diferença à média e o respectivo desvio padrão.

Para estes dados quantitativos, a semelhança calculou-se utilizando como coeficiente a distância Euclidiana média, que representa a distância entre os pontos representativos de duas amostras num espaço, que terá tantas dimensões quantas as características utilizadas. Para amostras iguais essa distância é zero, e aumenta com a dissemelhança entre amostras.

Dos vários métodos de agregação do tipo sequencial, aglomerativo, hierárquico e de não sobreposição, isto é, do tipo designado por SAHN (SNEATH e SOKAL, 1973), usou-se também o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages), já anteriormente referido no ponto 5.2.3.1., resultando o clássico fenograma.

Para aquele fenograma foi igualmente calculado o coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de valores cofenéticos que exprimem a relação de semelhança entre OTUs implícita no fenograma e a matriz de dissemelhança (ou semelhança), exprimindo esse coeficiente de correlação cofenética o grau de concordância entre aquelas duas matrizes.

Utilizou-se também, para uma melhor apreciação dos resultados e como complemento, o método de agregação da árvore de conexão mínima (MST - Minimum Spanning Tree), já referido no ponto 5.2.3.1..

O método de ordenação usado para obter uma imagem da distribuição dos pontos representativos das 59 árvores em estudo, no espaço a n dimensões, foi a análise em componentes principais, que permite reduzir o número de dimensões iniciais, projectando as árvores num novo sistema de eixos ortogonais. Estes eixos são escolhidos de modo a que o primeiro (primeira componente principal) tenha a direcção em que se verifica a maior dispersão dos pontos, outro (segunda componente principal) numa direcção em que, sendo ortogonal à primeira, se verifica a segunda maior dispersão dos mesmos pontos, e assim

sucessivamente. A análise em componentes principais obtém-se a partir da matriz de correlação entre variáveis sobre a qual são calculados os vectores próprios e os valores próprios. Com o programa PROJ que utiliza a matriz de vectores próprios e a matriz de dados estandardizados são calculadas as novas coordenadas dos OTUs, no novo sistema de eixos principais.

Foram ainda feitas as projecções das características morfológicas da cortiça nas três primeiras componentes principais, que nos permitem analisar a contribuição de cada característica na disposição espacial das árvores.

Finalmente, efectuou-se a comparação da matriz de semelhança baseada nos sistemas isoenzimáticos com a matriz de distâncias baseada nas características morfológicas da cortiça, e determinou-se o coeficiente de correlação.

A figura 4 mostra o fluxograma referente à análise da matriz de dados quantitativos, em que os nomes dos diferentes programas que operam sobre as matrizes são os usados no sistema de programas NTSYS (VER. 1.7) (ROHLF, 1992).

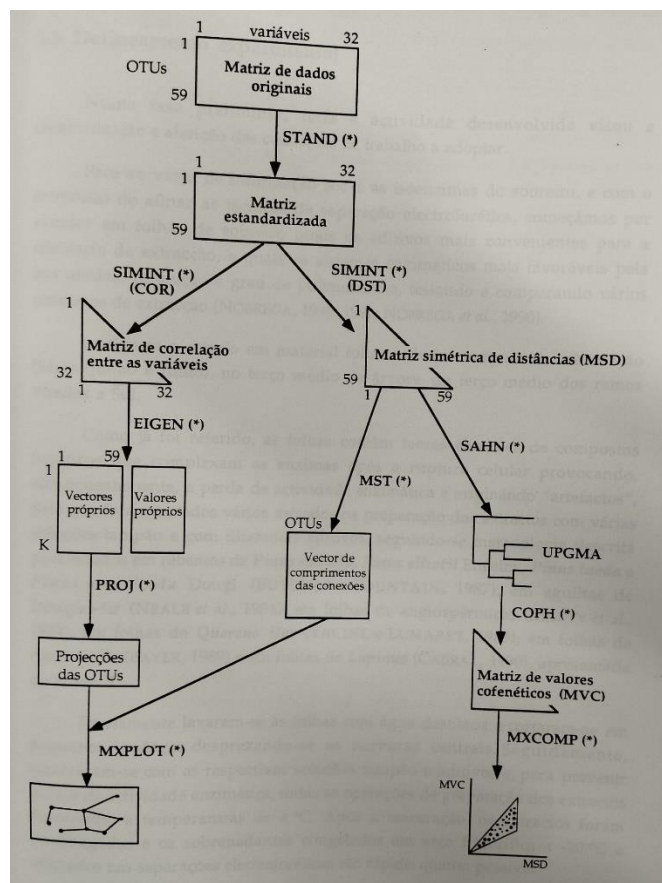


Fig. 4 - Fluxograma para dados quantitativos. (*) Programas que operam sobre as matrizes usadas no sistema de programas NTSYS (VER. 1.7)

5.3. Delineamento experimental

Numa fase preliminar, toda a actividade desenvolvida visou a sistematização e aferição das condições de trabalho a adoptar.

Face ao vazio de informação sobre as isoenzimas do sobreiro, e com o propósito de afinar as técnicas de separação electroforética, começámos por estudar em folhas de sobreiro quais os aditivos mais convenientes para a eficiência da extracção, e quais os sistemas enzimáticos mais favoráveis pela sua nitidez, resolução e grau de polimorfismo, testando e comparando vários processos de extracção (NÓBREGA, 1990, 1992; NÓBREGA *et al.*, 1990).

Iniciou-se o estudo em material foliar colhido na época de rebentação (Maio, Junho e Julho), no terço médio da árvore, do terço médio dos ramos virados a Sul.

Como já foi referido, as folhas contêm teores elevados de compostos fenólicos que complexam as enzimas após a ruptura celular provocando, conseqüentemente, a perda de actividade enzimática e originando “artefactos”, pelo que foram testados vários métodos na preparação dos extractos com várias soluções tampão e com diferentes aditivos, seguindo-se metodologia descrita para estudos em rebentos de *Pinus radiata*, *Pinus elliotii* Engelm., *Pinus taeda* e *Pinus monticola* Dougl. (BUTCHER e FOUNTAIN, 1987), em agulhas de Douglas-fir (NEALE *et al.*, 1984), em folhas de angiospérmicas (MARTY *et al.*, 1984), em folhas de *Quercus ilex* (YACINE e LUMARET, 1989), em folhas de *Antennaria* (BAYER, 1989) e em folhas de *Lupinus* (CABRAL, 1990), apresentada no anexo II.

Previamente lavaram-se as folhas com água destilada e cortaram-se em pequenos pedaços desprezando-se as nervuras centrais. Seguidamente, maceraram-se com as respectivas soluções tampão e aditivos e, para prevenir perdas de actividade enzimática, todas as operações de preparação dos extractos decorreram a temperaturas de 4 °C. Após a maceração, os extractos foram centrifugados e os sobrenadantes congelados em arca frigorífica a -20 °C e utilizados nas separações electroforéticas tão rápido quanto possível.

Os sistemas enzimáticos seleccionados para iniciar o estudo foram as α,β -carboxilesterases (EC.3.1.1.1) e as fosfatases ácidas (EC.3.1.3.2), por serem referidos como possuidores de elevado grau de polimorfismo e boa reprodutibilidade.

Para a separação das isoenzimas utilizou-se a técnica de electroforese horizontal em gel de poliacrilamida, segundo a técnica proposta por DAVIS (1964) e ORNSTEIN (1964), em gel a 7,5% de acrilamida, e a revelação dos zimogramas de acordo com a metodologia descrita por SCANDALIOS (1969) e por MARKERT e HUNTER (1959), respectivamente.

Como resultado deste estudo inicial verificou-se que, para eliminar os problemas de inibição das enzimas, a maior eficiência se conseguia para a solução de extracção com mais aditivos (NÓBREGA, 1990).

Mesmo assim, os perfis isoenzimáticos resultavam pouco nítidos e com fraca resolução, pelo que decidimos testar o pólen, comparando os perfis isoenzimáticos.

Para a colheita do pólen, realizada em Maio/Junho, trouxeram-se para o laboratório, em sacos de papel poroso, os ramos em floração antes de ocorrer a deiscência, das mesmas árvores seleccionadas.

As amostras foram mantidas numa sala climatizada a 25 °C e 60% de humidade relativa até se começar a libertar o pólen, que depois de recolhido foi crivado e armazenado numa arca frigorífica a -20 °C.

Na preparação dos extractos enzimáticos procedeu-se igualmente à comparação de vários processos de extracção, seguindo a metodologia descrita para estudos do pólen (MÄKINEN e BREWBAKER, 1967; WEEDEN e GOTTLIEB, 1980; BAYER, 1989; WENDEL e WEEDEN, 1989), descritos no anexo III, e de acordo com a nitidez e resolução dos zimogramas obtidos, optou-se pelo método de extracção relativamente simples, segundo WENDEL e WEEDEN (1989).

Para a separação das isoenzimas recorreu-se igualmente à electroforese horizontal em gel de 7,5% de acrilamida, e os extractos foram preparados por maceração do pólen com os vários meios de extracção, seguida de centrifugação e recolha dos sobrenadantes posteriormente conservados a -20 °C. Durante todo o processo de preparação foi mantida a temperatura a 4 °C. As separações electroforéticas foram realizadas de imediato e as isoenzimas testadas foram: α,β -carboxilesterases (EC.3.1.1.1), fosfatase ácida (EC.3.1.3.2), aspartato aminotransferase (EC.2.6.1.1), fosfogluose isomerase (EC.5.3.1.9), álcool desidrogenase (EC.1.1.1.1) e leucina aminopeptidase (EC.3.4.11.1).

Nesta fase preliminar testaram-se também os parâmetros da electroforese, a amperagem e voltagem na fonte de alimentação, tendo em atenção o tempo gasto na execução da electroforese (3 horas) para evitar a difusão das bandas e o calor desenvolvido na unidade horizontal de electroforese. Durante o processo de separação a temperatura na unidade horizontal foi mantida constante e uniforme, por circulação de água na placa de refrigeração do gel, através de um banho termostaticado de circulação forçada, de modo a que a temperatura na tina de separação se mantivesse nos 4 °C.

Após todo o trabalho de acerto de metodologia, iniciou-se então a fase de estudo, propriamente dita.

5.4. Revelação das enzimas

Iniciaram-se em 1865 os estudos de detecção de actividades enzimáticas em pólen, por via indirecta através de reacções do pólen com um substracto específico ou por formação de um produto específico.

VAN TIEGHEM (1869) revelou a invertase no pólen de *Narcissus*, enquanto ERLÉNMEYER (1874) encontrou a amilase no *Pinus* e STRASBURGER (1886) e GREEN (1894) além daquelas duas revelaram a hemicelulase.

Mais tarde, KAMMANN (1912) adicionou àquela lista a protease, catalase e lipase no arroz, mais recentemente, MÄKINEN e MACDONALD (1968) e BREWBAKER (1971) publicaram listas com 34 e 39 enzimas consideradas activas no pólen e STANLEY e LINSKENS (1974) elevou aquele número para 80.

Muitos têm sido os trabalhos realizados com o pólen, como referem os volumes publicados por HESLOP-HARRISON (1971) e STANLEY e LINSKENS (1974), dos quais se pode destacar o realizado por MÄKINEN e BREWBAKER (1967), que demonstraram, através de um estudo de difusão de enzimas dos grãos de pólen, que as α,β -carboxilesterases (EC.3.1.1.1), a leucina aminopeptidase (EC.3.4.11.1), a fosfatase ácida (EC.3.1.3.2), a catalase (EC.1.11.1.7) e a amilase (EC.3.2.1.1) são enzimas que rapidamente se difundem dos grãos de pólen.

Outros estudos sobre a localização e actividade enzimática da fosfatase ácida (EC.3.1.3.2), α,β -carboxilesterases (EC.3.1.1.1), amilase (EC.3.2.1.1) e protease (EC.3.4.4.1) na parede dos grãos de pólen, realizados em 50 pólenes de angiospérmicas, mostraram que a actividade enzimática está associada principalmente com a intina (KNOX e HESLOP-HARRISON, 1970, 1971).

Nestes últimos anos têm surgido um grande número de trabalhos sobre as isoenzimas de várias espécies, encontrando-se uma revisão exhaustiva sobre o assunto em dois volumes publicados por TANKSLEY e ORTON (1983), e pela pesquisa bibliográfica que se fez temos conhecimento de vários estudos sobre o género *Quercus*, e muito pouca informação sobre a abordagem da espécie *Quercus suber*, alvo do nosso estudo.

Neste sentido, e cruzando a informação sobre as isoenzimas do pólen e do género *Quercus*, verificou-se que a fosfatase ácida (EC.3.1.3.2) é a enzima mais estudada pela sua fácil identificação e grande reprodutibilidade, as α,β -carboxilesterases (EC.3.1.1.1) cuja actividade também é alta e originam

zimogramas com um elevado grau de bandas polimórficas, e igualmente a leucina aminopeptidase (EC.3.4.11.1) (MÄKINEN e MACDONALD, 1968; WEEDEN e GOTTLIEB, 1980; SHELDON e WEIGHT, 1989; CHECHOWITZ *et al.*, 1990; ELENA-ROSSELLO *et al.*, 1992).

O estudo destes sistemas enzimáticos realizado por ELENA-ROSSELLO *et al.* (1992) para verificação da ocorrência de hibridação entre *Quercus ilex* e *Quercus suber*, demonstrou também não haver variação relativamente à idade das árvores e às condições ambientais.

CHECHOWITZ *et al.* (1990), no estudo igualmente realizado para verificação da hibridação entre *Quercus macrocarpa* e *Quercus gambelii*, utilizaram também estes sistemas enzimáticos e ainda a álcool desidrogenase (EC.1.1.1.1), a NADH diaforase (EC.1.6.4.3), a fosfoglucose isomerase (EC.5.3.1.9), a glutamato desidrogenase (EC.1.4.1.2), a isocitrato desidrogenase (EC.1.1.1.42), a fosfoglucomutase (EC.2.7.5.1) e a malato desidrogenase (EC.1.1.1.37).

Para elucidar as relações sistemáticas de *Quercus*, SHELDON e WEIGT (1989) estudaram os mesmos sistemas enzimáticos em *Quercus rubra*, *Quercus alba* e *Quercus laevis*, também utilizados por MÜLLER-STARCK *et al.* (1993) para estudar a variação genética em *Quercus robur* e *Quercus petraea*, utilizados por KIM *et al.* (1993) para seis outras espécies de *Quercus*, enquanto YACINE e LUMARET (1989) e LUMARET *et al.* (1991), utilizaram, para o *Quercus ilex*, três marcadores isoenzimáticos, a fosfoglucose isomerase (EC.5.3.1.9), a álcool desidrogenase (EC.1.1.1.1), a isocitrato desidrogenase (EC.1.1.1.42).

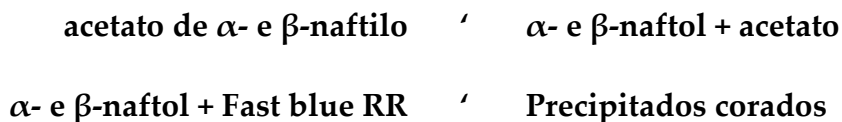
Os estudos referidos na pesquisa bibliográfica efectuada diferem nos métodos electroforéticos utilizados, no tipo de tecido analisado, e nos métodos de coloração dos vários sistemas enzimáticos, o que dificulta a comparação de resultados e permite apenas verificar quais os mais utilizados e com maior grau de polimorfismo e melhor reprodutibilidade.

Assim, seleccionámos para iniciar este estudo os seguintes sistemas enzimáticos abaixo referidos, e para a revelação desses sistemas enzimáticos foram testados vários métodos de coloração com o objectivo de melhorar a visualização das bandas, adoptando-se os métodos referidos no anexo IV.

As α,β -carboxilesterases, (EC.3.1.1.1 - EST), são hidrolases que catalisam ligações entre ácidos carboxílicos e alcoóis ou fenóis. Na sua revelação utilizou-se como substrato o acetato de α -naftilo e o acetato de β -naftilo, que como resultado

da actividade da enzima libertam grupos acetato, α - e β -naftol, que ao combinarem-se com sais de diazónio do corante originam a formação de precipitados corados.

α, β -carboxilesterases



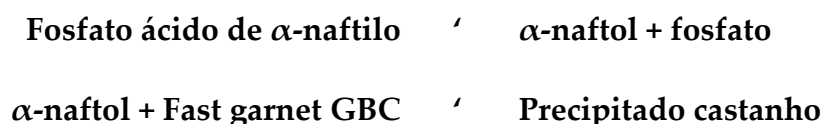
A revelação foi feita de acordo com a metodologia proposta por MARKERT e HUNTER (1959) descrita em CABRAL (1990).

As fosfatases ácidas, (EC. 3.1.3.2. - ACP), são hidrolases de um monoéster fosfórico que catalisa reacções do tipo:



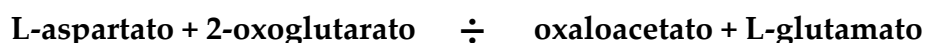
Na revelação utilizou-se o fosfato ácido de α -naftilo como substrato, e como resultado da actividade enzimática libertam-se ácido ortofosfórico e α -naftol que originam a formação de derivados corados pela combinação com sais de diazónio, seguindo-se a metodologia proposta por SCANDALIOS (1969).

Fosfatase ácida

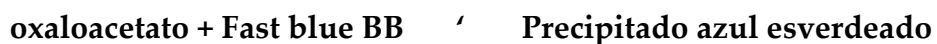


A aspartato aminotransferase, (EC.2.6.1.1. - GOT), é uma transferase que transfere reversivelmente grupos amino de α -aminoácidos para α -oxoácidos na presença de fosfato 5-piridoxal e que catalisa reacções do tipo.

Aspartato aminotransferase



A revelação ocorre pela reacção específica e espontânea entre o oxaloacetato e o sal de diazónio, seguindo a metodologia proposta por SCHWARTZ (1963).



As fosfoglucose isomerases, (EC.5.3.1.9 - PGI), são oxirredutases intramoleculares que convertem reversivelmente aldoses em cetoses e catalisam reacções do tipo:

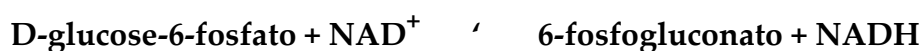


Na revelação utiliza-se como substrato a D-frutose-6-fosfato e o NAD como coenzima, que sofre várias transformações por acção da actividade da enzima resultando um precipitado azul.

Fosfoglucose isomerase



6-Fosfogluconato desidrogenase



As álcoois desidrogenases, (EC.1.1.1.1 - ADH), são oxirredutases que actuam sobre os álcoois e na sua revelação utiliza-se como substrato o etanol que sofre as seguintes transformações por acção da enzima e origina um precipitado azul.

Álcool desidrogenase



A leucina aminopeptidase, (EC.3.4.11.1. - LAP), é uma hidrolase que hidrolisa ligações peptídicas e origina várias transformações pela sua actividade no substrato L-leucil- β -naftilamida resultando um precipitado violeta.

Leucina aminopeptidase

L-leucil- β -naftilamida ‘ **L-leucina + naftol**
naftol + Fast black K ‘ **precipitado violeta**

6. Resultados e Discussão

6.1. Estudo dos sistemas isoenzimáticos

6.1.1. Estimativa do polimorfismo intrapopulacional

Para o conjunto de indivíduos analisados e para cada sistema enzimático: α,β -carboxilesterases (EC.3.1.1.1), fosfatase ácida (EC.3.1.3.2), aspartato aminotransferase (EC.2.6.1.1), fosfoglucose isomerase (EC.5.3.1.9), álcool desidrogenase (EC.1.1.1.1) e leucina aminopeptidase (EC.3.4.11.1), registaram-se nos Quadros 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do anexo V, todas as bandas reveladas, caracterizadas pelos correspondentes valores de R_f que traduzem as suas mobilidades electroforéticas.

Para exemplificar os perfis electroforéticos obtidos para aqueles sistemas enzimáticos, apresentam-se a seguir as Fig. 5, 6, 7, 8, 9 e 10, no pólen de algumas árvores analisadas.

Da análise dos referidos quadros, observámos para as α,β -carboxilesterases (EC.3.1.1.1) a existência de 15 bandas isoenzimáticas e 35 perfis isoenzimáticos diferentes.

Verificámos ainda que aparecem algumas bandas raras para os valores de R_f 0,18 (frequência 4%), 0,44 (frequência 6%), 0,74 e 0,80 (frequências 3%), e outras bandas frequentes correspondentes ao R_f 0,50 (frequência 99%).

Para a **fosfatase ácida** (EC.3.1.3.2) encontrámos 11 bandas isoenzimáticas e 27 perfis electroforéticos diferentes, com uma banda monomórfica correspondente ao R_f 0,60 e algumas bandas raras para os valores de R_f 0,07 (frequência 7%), 0,10 (frequência 1%) e 0,22 (frequência 7%).

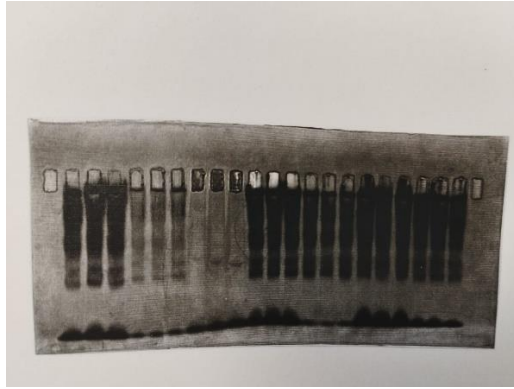


Fig. 5 - Perfis isoenzimáticos de α,β -carboxilesterases (EC.3.1.1.1)

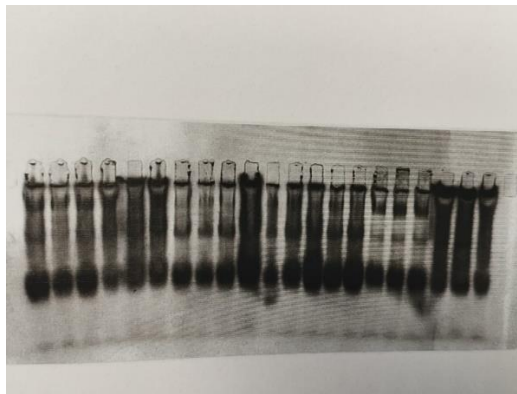


Fig. 6 - Perfis isoenzimáticos de fosfatases ácidas (EC.3.1.3.2)



Fig. 7 - Perfis isoenzimáticos de aspartato aminotransferases (EC.2.6.1.1)



Fig. 8 - Perfis isoenzimáticos de fosfoglucose isomerases (EC.5.3.1.9)



Fig. 9 - Perfis isoenzimáticos de álcool desidrogenases (EC.1.1.1.1)

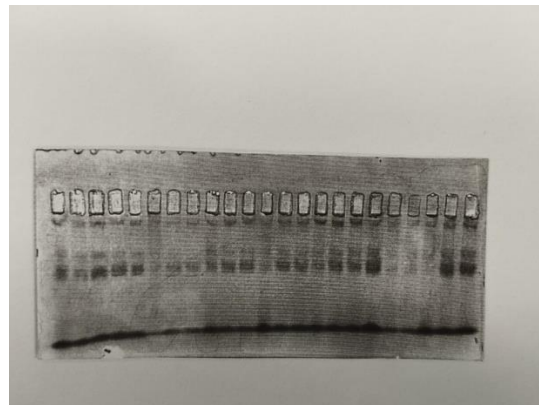


Fig. 10 - Perfis isoenzimáticos de leucina aminopeptidases (EC.3.4.11.1)

Para a **aspartato aminotransferase** (EC.2.6.1.1.) observámos 9 bandas isoenzimáticas e 26 perfis electroforéticos diferentes, com uma banda rara para o R_f 0,20 (frequência 9%).

Na **fosfoglucose isomerase** (EC.5.3.1.9) detectámos 11 bandas isoenzimáticas e 42 perfis electroforéticos diferentes, com algumas bandas raras para os valores de R_f 0,55 (frequência 10%) e 0,66 (frequência 7%).

Encontrámos para a **álcool desidrogenase** (EC.1.1.1.1) 7 bandas isoenzimáticas e 20 perfis electroforéticos diferentes, com uma banda rara para o valor de R_f 0,20 (frequência 7%) e uma banda frequente para o valor de R_f de 0,30 (frequência 90%).

Observámos para a leucina aminopeptidase (EC.3.4.11.1) a existência de 4 bandas isoenzimáticas e 6 perfis isoenzimáticos diferentes. Verificámos ainda que aparece uma banda rara para o valor de R_f 0,40 (frequência 4%), e outras bandas frequentes correspondentes ao R_f 0,07 (frequência 91%) e R_f 0,46 (frequência 97%).

Através das frequências relativas das bandas isoenzimáticas, efectuámos uma estimativa do polimorfismo intrapopulacional para cada sistema enzimático, calculando os respectivos índices de polimorfismo (PI), através da expressão referida no ponto 4.1.. Os valores encontram-se registados no quadro 2.

Quadro 2 - Frequências relativas das bandas isoenzimáticas e índices de polimorfismo

Sistema enzimático	R _f	Frequências relativas	Índices de polimorfismo
Carboxilesterase (EC.3.1.1.1)	0,07	0,377	0,154
	0,14	0,246	
	0,18	0,043	
	0,23	0,841	
	0,27	0,232	
	0,32	0,333	
	0,34	0,551	
	0,40	0,319	
	0,44	0,058	
	0,49	0,507	
	0,50	0,986	
	0,56	0,377	
	0,63	0,638	
	0,74	0,029	
0,80	0,029		
Fosfatase ácida (EC.3.1.3.2)	0,07	0,073	0,120
	0,10	0,015	
	0,13	0,101	
	0,16	0,667	
	0,22	0,087	
	0,31	0,797	
	0,34	0,130	
	0,40	0,159	
	0,46	0,464	
	0,51	0,261	
	0,60	1,000	
Aspartato aminotranferase (EC.2.6.1.1.)	0,20	0,087	0,165
	0,22	0,217	
	0,25	0,565	
	0,27	0,174	
	0,31	0,391	
	0,34	0,116	
	0,35	0,406	
	0,38	0,130	
0,41	0,188		
Fosfoglucose isomerase (EC.5.3.1.9)	0,07	0,261	0,175
	0,10	0,507	
	0,14	0,116	
	0,19	0,116	
	0,22	0,420	
	0,26	0,493	
	0,29	0,174	
	0,40	0,377	
	0,43	0,507	
	0,55	0,101	
0,66	0,072		
Álcool desidrogenase (EC.1.1.1.1)	0,20	0,072	0,136
	0,30	0,899	
	0,36	0,174	
	0,44	0,522	
	0,49	0,232	
	0,56	0,072	
	0,60	0,188	

Leucina aminopeptidase (EC.3.4.11.1)	0,07 0,31 0,40 0,46	0,913 0,855 0,043 0,971	0,068
Média ponderada			0,145

Na figura 11, está representada a variação dos índices de polimorfismo para cada sistema enzimático.

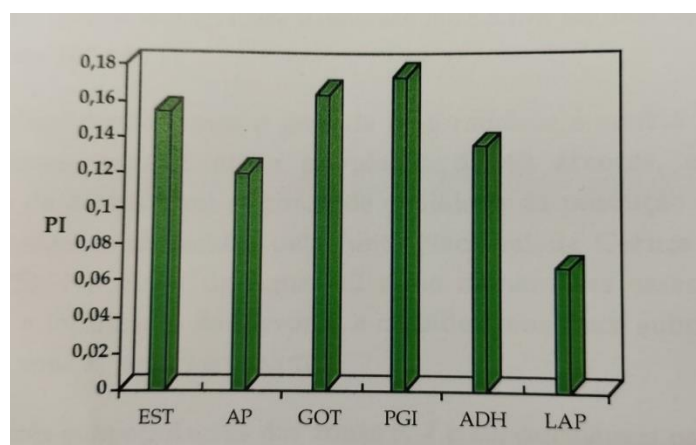


Fig. 11 - Variação dos índices de polimorfismo para cada sistema enzimático

Estes índices de polimorfismo podem variar de 0 a 0,25, tendo em consideração a proporção de bandas monomórficas e polimórficas e o grau de polimorfismo de cada uma das bandas variáveis (MARSHALL e ALLARD, 1970).

Atendendo ao valor da média ponderada para a população verificamos que o sobreiro é uma espécie com grande variabilidade intrapopulacional, encontrando-se o valor do índice de polimorfismo acima do nível médio.

A elevada variabilidade intrapopulacional do sobreiro poderá ser atribuída ao processo de reprodução por polinização cruzada e anemófila e à grande longevidade da espécie.

Alguns autores referem que as populações com grandes diferenças nos genótipos electroforéticos foram provavelmente sujeitas a diferentes processos selectivos, e podem ser consideradas boas fontes de diversidade genética.

Os povoamentos com grande diversidade genética, serão um património de grande interesse a preservar, e a variabilidade inerente a esta espécie constitui,

sem dúvida, uma base para o seu melhoramento genético, quer seja por processos naturais evolutivos, quer por processos artificiais no âmbito do melhoramento por selecção.

Da análise dos valores dos sistemas isoenzimáticos analisados, verificámos que apenas os índices de polimorfismo da fosfatase ácida (EC.3.1.3.2) e da leucina aminopeptidase (EC.3.4.11.1) se encontram abaixo do nível médio, sendo o mais variável a fosfoglucose isomerase (EC.5.3.1.9), seguida da aspartato aminotransferase (EC.2.6.1.1).

Para melhor conhecermos o grau de uniformidade e estabilidade desta espécie, tentámos, para a nossa população de 69 árvores, estabelecer subpopulações de acordo com as zonas de qualidade da produção de cortiça, convencionalmente estabelecidas pela Junta Nacional da Cortiça (SERVIÇO TÉCNICO, 1975). No mapa da figura 12 estão demarcadas essas zonas de qualidade com a localização das árvores, e considerámos cinco subpopulações: zona 5, zona 7, zona 8, zona 9 e zona 10.

Para as três subpopulações das zonas 5, 7 e 10, calculámos os índices de polimorfismo para os mesmos sistemas isoenzimáticos, referidos no quadro 3. As subpopulações das zonas 8 e 9 têm um número de árvores inferior a 5, pelo que não foram consideradas.

Quadro 3 - Índices de polimorfismo para as subpopulações

Subpopulação	Número indivíduos	Índices de polimorfismo						Média ponderada
		EST	ACP	GOT	PGI	ADH	LAP	
Zona 5	5	0,101	0,080	0,142	0,095	0,023	0,000	0,088
Zona 7	50	0,153	0,116	0,172	0,173	0,128	0,056	0,142
Zona 10	10	0,131	0,086	0,111	0,175	0,156	0,083	0,131
Média ponderada		0,133	0,099	0,154	0,159	0,120	0,048	0,119

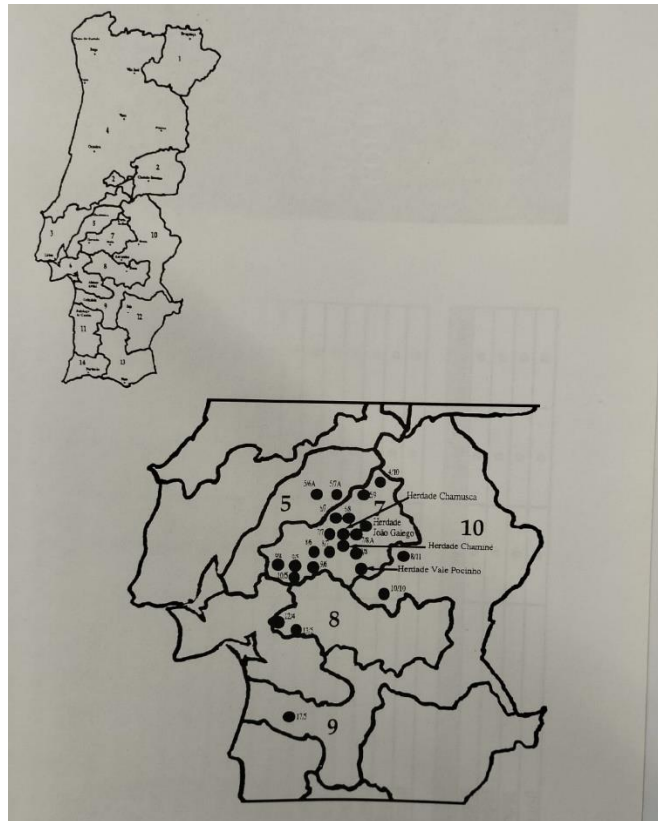


Fig. 12 - Mapa das zonas de produção de cortiça

Na figura 13 está representada a variação dos índices de polimorfismo para cada subpopulação e para cada sistema enzimático.

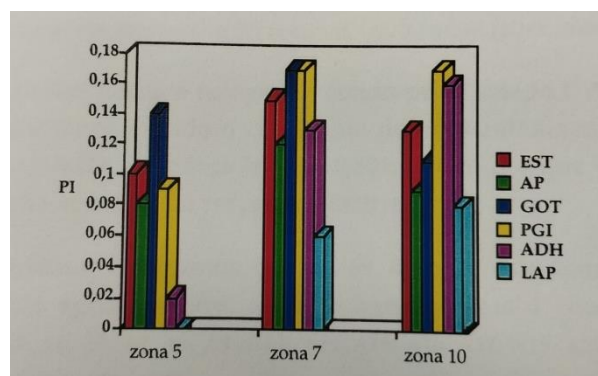


Fig. 13 - Variação dos índices de polimorfismo para cada subpopulação

Como mostra o quadro 3, o número de árvores em cada zona é diferente, e ainda reduzido nas zonas 5 e 10. No entanto, refere SINGH *et al.* (1973), que é possível

considerarem-se amostras de 5 e 10 indivíduos para estudos de identificação, e, por isso, optámos por considerar estas subpopulações.

A análise dos valores das médias ponderadas dos índices de polimorfismo das zonas 5, 7 e 10, mostra-nos que as subpopulações das zonas 7 e 10 possuem valores superiores ao nível médio, e que a zona 7 apresenta o maior nível de polimorfismo.

Em relação aos sistemas enzimáticos, podemos verificar que a fosfoglucose isomerase (EC.5.3.1.9) apresenta a maior variação para esta espécie, seguida da aspartato aminotransferase (EC.2.6.1.1). A leucina aminopeptidase (EC.3.4.11.1) é o sistema enzimático com a menor variação.

A elevada variabilidade intrapopulacional encontrada nestas subpopulações, poderá ser atribuída à taxa de fecundação cruzada desta espécie e não parece ser significativamente influenciada pelo ambiente.

6.1.2. Análise dos dados electroforéticos

No anexo VI apresentamos o registo conjunto das bandas analisadas nos 6 sistemas enzimáticos, eliminando-se as bandas que nos deixavam dúvidas quanto à sua reprodutibilidade ($R_f=0,80$ para as α,β -carboxilesterases), e as bandas constantes ($R_f=0,60$ para a fosfatase ácida), e que representa a matriz de dados com 69 linhas (as árvores) e 55 colunas (as bandas izoenzimáticas).

A figura 14 representa o fenograma obtido pelo método UPGMA, aplicado à matriz de semelhança usando o coeficiente de emparelhamento simples. O coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,801, que indica que o fenograma é uma representação aceitável da respectiva matriz.

Da sua análise verificamos que as 69 árvores estudadas podem ser separadas em três agrupamentos, sendo o agrupamento 1 constituído pelas árvores A1, A2, A3, A4, A6, A7, A8, A9, A11, A14, A15, A16, A17, A18, A21, A34, A35, A44, A45, A46, A47, A51, A53, A57 e A59.

O agrupamento 2 está subdividido em dois: 2a e 2b, sendo o 2a constituído pelas árvores A5, A10, A20, A23, A24, A26, A31, A32, A33, A39, A40, A41, A42, A43, A48, A49 e A60, e o 2b pelas árvores A13, A22, A25, A27, A28, A29, A30, A36, A37, A38, A50, A52, A54, A55, A56, A58, A61, A62, A63, A64, A65, A66, A67, A68 e A69.

O agrupamento 3 engloba apenas as árvores A12 e A19, das parcelas 6/7 e 7/7 respectivamente, ambas localizadas na zona 7.

No quadro 4 apresenta-se a distribuição das árvores no agrupamento 1 e nos subagrupamentos 2a e 2b, considerando as suas localizações nas parcelas e estas nas respectivas zonas, e podemos verificar duas situações: uma, em que árvores pertencentes à mesma parcela se encontram agregadas no mesmo agrupamento, e outra em que árvores da mesma parcela se situam em agrupamentos diferentes. O mesmo se verifica para as zonas, isto é, não há uma agregação das árvores com base na zona de localização das parcelas.

Por esta análise podemos verificar que não há uma hierarquia clara que leve à separação dos agrupamentos.

Por um lado, os perfis izoenzimáticos semelhantes ocorrem em zonas geográficas distintas, o que confirma a independência das izoenzimas em relação ao ambiente. Por outro lado, as árvores da mesma parcela distribuem-se por agrupamentos distintos, o que parece mostrar a grande variabilidade genética dessas mesmas árvores.

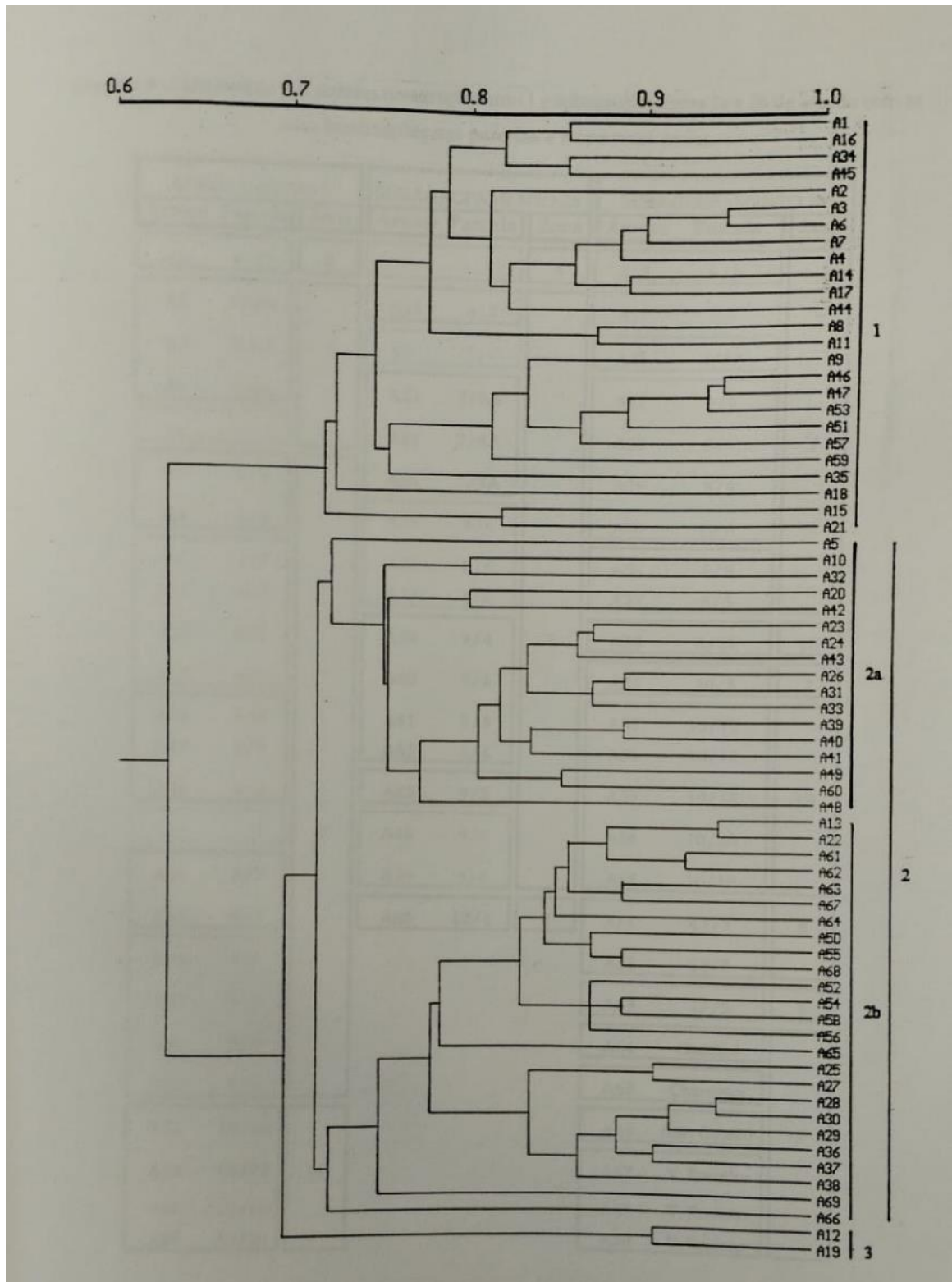


Fig. 14 - Fenograma das 69 árvores baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,801$)

Quadro 4 - Distribuição das árvores no agrupamento 1 e subagrupamentos 2a e 2b de acordo com as suas localizações nas parcelas e respectivas zonas

AGRUPAMENTO 1			SUBAGRUPAMENTO 2a			SUBAGRUPAMENTO 2b			
Árvore	Parcela	Zona	Árvore	Parcela	Zona	Árvore	Parcela	Zona	
A1	4/10	7	A5	5/7A	5	A13	6/7	7	
A2	5/6A	5	A10	6/7	7	A22	7/7		
A3	5/6A		A20	7/7		A25	7/8A		
A4	5/6A		A23	7/8A		A27	8/6		
A6	5/7A		A24	7/8A		A28	8/6		
A7	5/9	7	A26	7/8A		A29	8/6		
A8	5/9		A31	8/6		A30	8/6		
A9	6/7		A32	8/6		A36	8/8		
A11	6/7		A33	8/6		A37	8/8		
A14	6/7		A39	9/4		A38	8/11		10
A15	6/7		A40	9/4		A50	10/5	7	
A16	6/8		A41	9/4	A52	10/10	10		
A17	6/8		A42	9/4	A54	10/10			
A18	6/8		A43	9/5	A55	10/10			
A21	7/7		A48	9/6	A56	10/10			
A34	8/7	7	A49	9/6	A58	10/10			
A35	8/7		A60	12/4	8	A61	13/5	8	
A44	9/6		10			A62	13/5	7	
A45	9/6					A63	17/5		9
A46	9/6					A64	Chaminé		7
A47	9/6					A65	Chamusco		
A51	10/10		10			A66	João Galego	7	
A53	10/10					A67	V. Pocinho		
A57	10/10					A68	V. Pocinho		
A59	10/10					A69	V. Pocinho		

Nota: Sempre que árvores da mesma parcela se distribuem por diferentes agrupamentos foi usada uma cor, que é comum à parcela em causa. Sempre que as árvores de uma determinada parcela estão todas contidas no mesmo agrupamento foi usada a cor preta.

Na figura 15 são apresentados os resultados das projecções das árvores no plano definido pelas primeira e segunda coordenadas principais, à qual se sobrepôs a árvore de conexão mínima. Os valores da percentagem de variância total explicada por cada um dos eixos coordenados é de 23,14 para a primeira e 10,84 para a segunda, e a percentagem acumulada para as três primeiras coordenadas principais é de 40,79, que se podem considerar um resumo relativamente pobre da informação original.

Ao sobrepôr-se a árvore de conexão mínima, esta permite também detectar três agrupamentos de árvores, consistentes com os agrupamentos 1, 2a e 2b detectados no fenograma, e com as árvores A12 e A19 agora englobadas no agrupamento 2a.

Embora a análise de agregação, a análise em coordenadas principais e a árvore de conexão mínima tenham conduzido a resultados com uma congruência aceitável, o elevado polimorfismo isoenzimático revelado pelos seis sistemas enzimáticos analisados e a grande variabilidade genética intrapopulacional, não nos permitem diferenciar as árvores em estudo. Por isso, apresentamos na figura 16 os diagramas electroforéticos “teóricos”, desenhados com base nos perfis isoenzimáticos das árvores constituintes de cada agrupamento e considerando-se uma frequência de 50% de presença das bandas.

Uma hipótese de análise explicativa destes agrupamentos seria baseada na distribuição geográfica, mas verificámos que a distribuição das árvores pelos diferentes grupos é independente da sua localização.

Se bem que não excluindo a heterogeneidade ambiental, outras hipóteses explicativas desta heterogeneidade devem relacionar-se fortemente com a estrutura populacional.

A estrutura populacional, considerada como a totalidade das relações ecológicas e genéticas entre os indivíduos, pode variar drasticamente ao longo da distribuição geográfica das populações, através do movimento dos genes, via dispersão do pólen, entre as populações ou subdivisões da população.

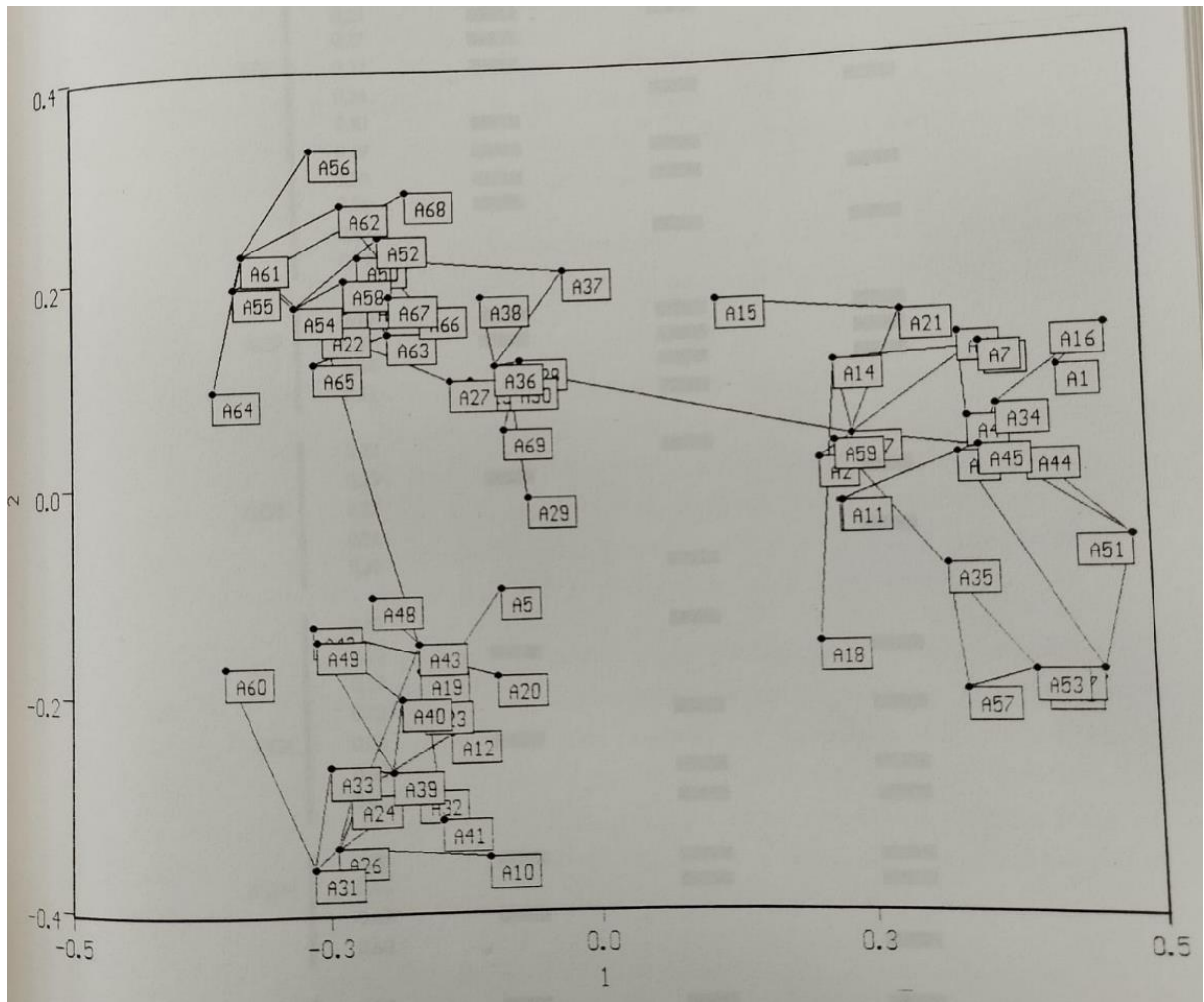


Fig. 15 - Projeção das 69 árvores no plano definido pela primeira coordenada principal (23,14%) e pela segunda coordenada principal (10,84%) com base nos seis sistemas enzimáticos, à qual se sobrepôs a árvore de conexão mínima

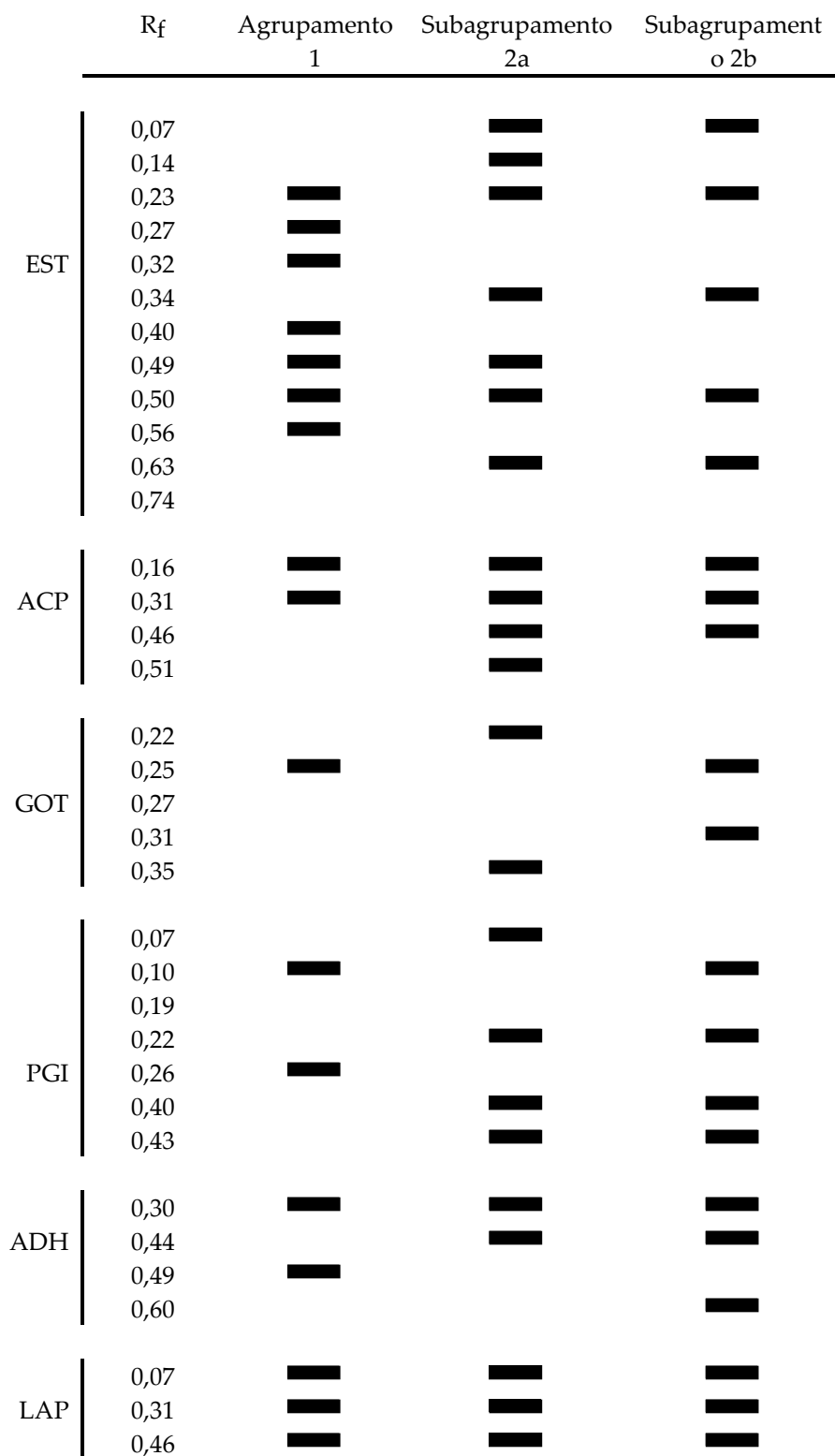


Fig. 16 - Diagramas electroforéticos "teóricos" para os três agrupamentos com base nos perfis izoenzimáticos das árvores constituintes de cada agrupamento e considerando-se uma frequência de 50% de presença das bandas.

Alguns estudos já realizados por diversos autores, revelam que as espécies florestais têm altos níveis de diversidade genética, e esses resultados permitem concluir que as espécies com grandes distribuições geográficas, reprodução por polinização cruzada e anemófila e longos períodos de vida tendem a ter uma maior variação genética isoenzimática.

Normalmente, as espécies florestais distribuem-se de forma contínua e por vastas áreas geográficas, e o efeito do fluxo génico, que se traduz num declínio da variabilidade genética tanto mais acentuado quanto mais reduzidas são as populações, não tem aqui esse impacto.

De facto, a extensão do movimento dos genes influencia os níveis de diversidade genética e o tamanho efectivo das populações (BROWN, 1978; ADAMS, 1992).

Refere HAMRICK *et al.* (1992) e ELLSTRAND (1992), que para níveis de fluxo génico altos se verifica o aumento do tamanho efectivo da população com redução da diferenciação genética, enquanto os baixos níveis afectam a variação genética dentro das populações, muitas vezes sem efeitos na diferenciação, mas desempenhando um papel importante na sua evolução por introdução e conservação de variação genética dentro da população.

Por outro lado, durante os seus longos períodos de vida as espécies florestais experimentam várias flutuações ambientais, que afectam o desenvolvimento e sobrevivência das sementes e plântulas impondo-lhes uma selecção no sentido da conservação de uma maior diversidade genética. Além disso, devido ao seu longo ciclo de vida, têm uma descendência mais numerosa, e portanto maior probabilidade para que ocorram todos os genótipos possíveis, mantendo a diversidade genética original.

Nas espécies florestais, admite-se ainda que o elevado grau de polimorfismo isoenzimático é um reflexo de mecanismos evolutivos e sistema reprodutivo da espécie, ocorrendo a evolução por alterações nas frequências dos genes e genótipos.

Assim, podemos também considerar que a variabilidade genética aparece como resultado da actuação de várias forças evolutivas, como a mutação e a recombinação, e por um processo de selecção natural que actua sobre o fenótipo, em que alguns alelos são favorecidos ou não de acordo com o valor

adaptativo com que participam na expressão do fenótipo (GREGORIUS e BERGMANN, 1995).

Por isso, talvez se possa atribuir o polimorfismo genético do sobreiro ao fluxo génico, característico desta espécie predominantemente alogâmica, e provavelmente a processos evolutivos.

Face à informação disponível e ao desconhecimento da origem das parcelas consideradas neste estudo, não nos é possível tirar mais conclusões sobre os agrupamentos definidos pela análise dos resultados.

No prosseguimento deste estudo e para a concretização do segundo objectivo proposto, estabelecer possíveis relações entre indivíduos dadores de boa e má cortiça e os seus modelos electroforéticos das isoenzimas, para selecção atempada, e pelas razões já apresentadas no ponto 5.2.3.2., retiraram-se as árvores A1, A27, A28, A29, A30, A31, A32, A33, A38 e A41, e refez-se toda a análise de resultados agora para as 59 árvores.

Preparou-se previamente a matriz de dados com 59 linhas (as árvores) e 55 colunas (as bandas izoenzimáticas), e a figura 17 representa o fenograma obtido pelo método UPGMA, aplicado à matriz de semelhança usando o coeficiente de emparelhamento simples. O coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,815, que indica que o fenograma é uma representação aceitável da respectiva matriz.

Pela sua análise verificamos algumas alterações na agregação das árvores em relação à análise anterior, e vamos manter a mesma simbologia para os agrupamentos para facilidade de comparação. Assim, observam-se também três agrupamentos, mas apenas o agrupamento 1 se mantém com a mesma constituição do agrupamento 1 anterior.

Aparece também um agrupamento 2 subdividido em dois: 2a e 2b, tendo o 2a agregado a árvore A66 e perdido as árvores A5 e A10, que constituem agora um novo agrupamento 3. O 2b agregou as árvores A12 e A19, que formavam na análise anterior um agrupamento, e perdeu a árvore A66. No quadro 5 apresenta-se a distribuição das árvores pelos agrupamentos 1, 2a e 2b, referindo as suas localizações nas parcelas e respectivas zonas.

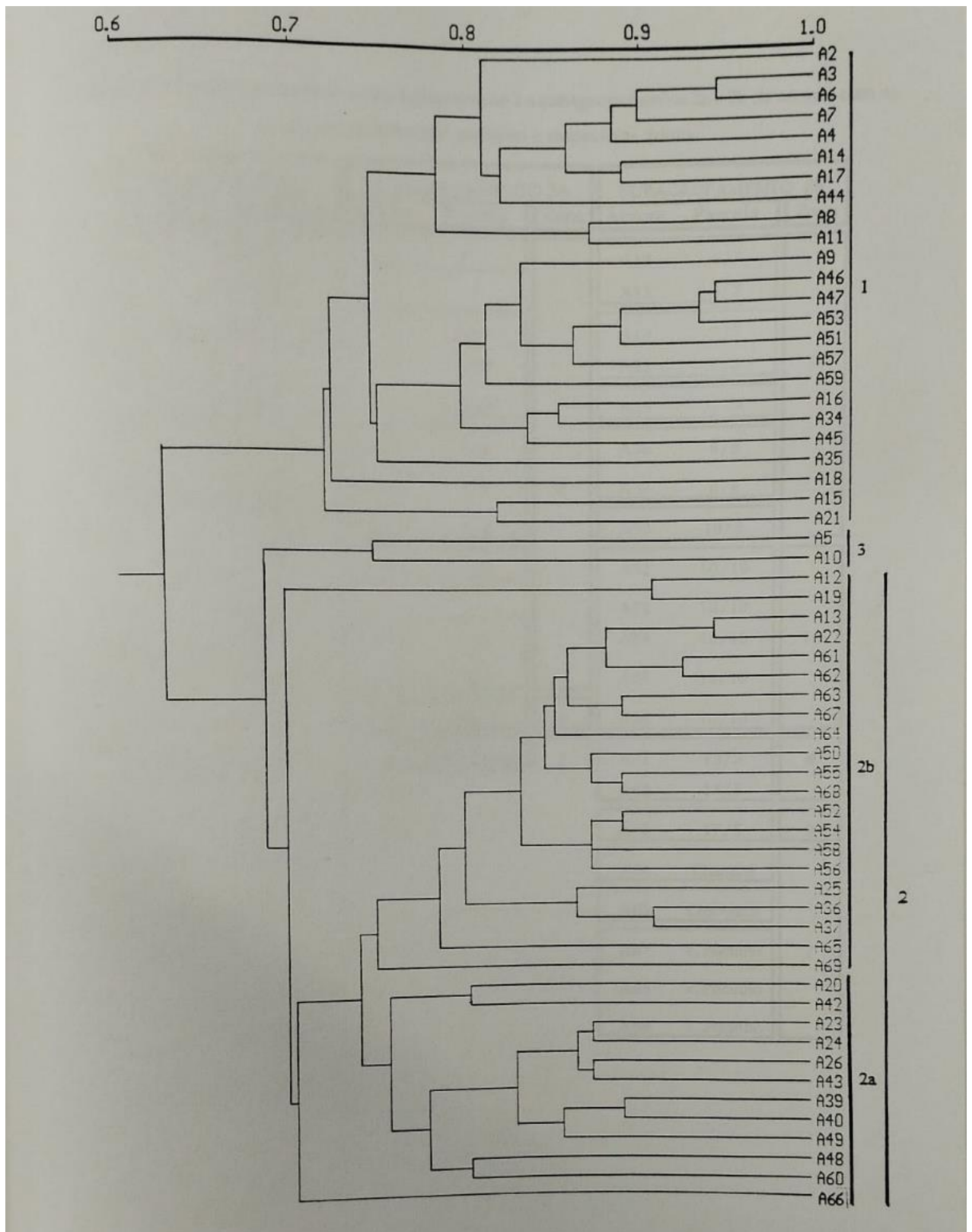


Fig. 17 - Fenograma das 59 árvores baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,815$)

Quadro 5 - Distribuição das árvores no agrupamento 1 e subagrupamentos 2a e 2b de acordo com as suas localizações nas parcelas e respectivas zonas

AGRUPAMENTO 1			SUBAGRUPAMENTO 2A			SUBAGRUPAMENTO 2B			
Árvore	Parcela	Zona	Árvore	Parcela	Zona	Árvore	Parcela	Zona	
A2	5/6A	5	A20	7/7	7	A12	6/7	7	
A3	5/6A					A13	6/7		
A4	5/6A		A23	7/8A		A19	7/7		
			A24	7/8A		A22	7/7		
A6	5/7A		A26	7/8A		A25	7/8A		
A7	5/9	7	A39	9/4	7	A36	8/8	7	
A8	5/9		A40	9/4		A37	8/8		
A9	6/7		A42	9/4		A50	10/5		
A11	6/7		A43	9/5	A52	10/10	10		
A14	6/7				A54	10/10			
A15	6/7		A48	9/6	A55	10/10			
			A49	9/6	A56	10/10			
A16	6/8			A60	12/4	8	A58	10/10	
A17	6/8			A66	João Galego	7	A61	13/5	8
A18	6/8						A62	13/5	
A21	7/7					A63	17/5	9	
A34	8/7	7				A64	Chaminé	7	
A35	8/7				A65	Chamusco			
A44	9/6				A67	V. Pocinho			
A45	9/6				A68	V. Pocinho			
A46	9/6			A69	V. Pocinho				
A47	9/6								
A51	10/10	10							
A53	10/10								
A57	10/10								
A59	10/10								

Nota: Sempre que árvores da mesma parcela se distribuem por diferentes agrupamentos foi usada uma cor, que é comum à parcela em causa. Sempre que as árvores de uma determinada parcela estão todas contidas no mesmo agrupamento foi usada a cor preta.

Na figura 18 são apresentados os resultados das projecções das árvores no plano definido pelas primeira e segunda coordenadas principais, à qual se sobrepôs a árvore de conexão mínima. Os valores da percentagem de variância total explicada por cada um dos eixos coordenados é de 18,30 para a primeira e 8,00 para a segunda, e a percentagem acumulada para as três primeiras coordenadas principais é de 32,07, que se podem considerar um resumo muito pobre da informação original.

Ao sobrepôr-se a árvore de conexão mínima, detectamos também três agrupamentos de árvores, o agrupamento 1 consistente com o agrupamento 1 do fenograma, e os outros dois com algumas alterações. As árvores A5 e A10 juntaram-se ao subagrupamento 2a, e as árvores A12, A19 e A66 trocaram de agrupamento.

Em relação aos diagramas electroforéticos “teóricos” não houve alterações para estes agrupamento, mantendo-se os mesmos perfis referidos na figura 16.

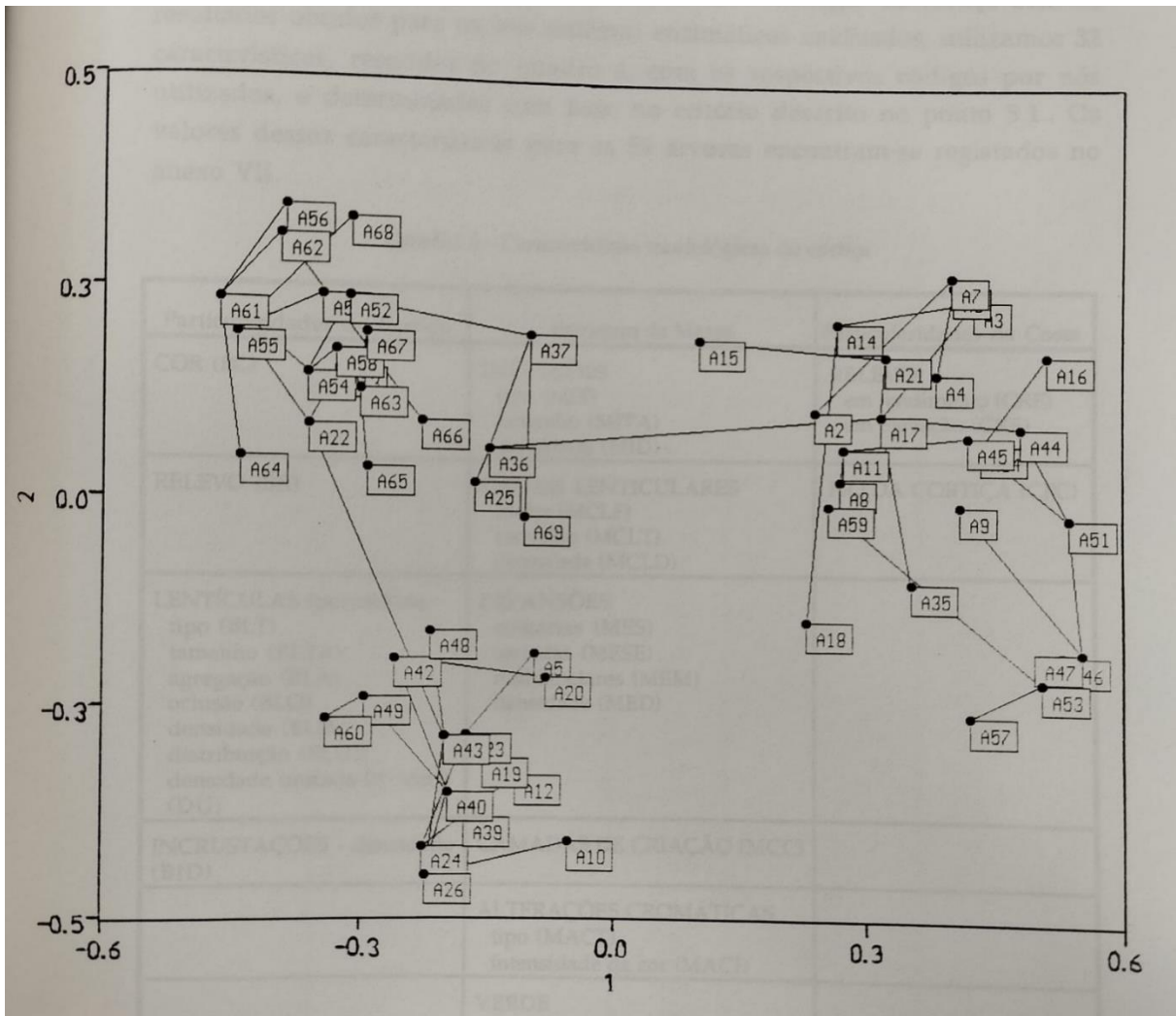


Fig. 18 - Projecção das 59 árvores no plano definido pela primeira coordenada principal (18,30%) e pela segunda coordenada principal (8,00%) com base nos seis sistemas enzimáticos, à qual se sobrepôs a árvore de conexão mínima

6.2. Descrição morfológica da cortiça

Na tentativa de podermos relacionar a morfologia da cortiça com os resultados obtidos para os seis sistemas enzimáticos analisados, utilizamos 32 características, referidas no quadro 6, com os respectivos códigos por nós utilizados, e determinadas com base no critério descrito no ponto 5.1. Os valores dessas características para as 59 árvores encontram-se registados no anexo VII.

Quadro 6 - Características morfológicas da cortiça

Particularidades da Barriga	Estrutura da Massa	Particularidades da Costa
COR (BC)	INCLUSÕES tipo (MIT) tamanho (MITA) densidade (MID)	RELEVO em fendimento (CRF) em elevação (CRE)
RELEVO (BR)	CANAIS LENTICULARES forma (MCLF) tamanho (MCLT) densidade (MCLD)	FIO DA CORTIÇA (CFC)
LENTÍCULAS (porosidade) tipo (BLT) tamanho (BLTA) agregação (BLA) oclusão (BLO) densidade (BLD) distribuição (BLDI) densidade unitária (n ^o /cm ²) (DU)	EXPANSÕES solitárias (MES) seriadas (MESE) multianelares (MEM) densidade (MED)	
INCRUSTAÇÕES - densidade (BID)	CAMADAS DE CRIAÇÃO (MCC)	
	ALTERAÇÕES CROMÁTICAS tipo (MACT) intensidade da cor (MACI)	
	VERDE intensidade de formação (MVI) extensão superficial (MVE) distribuição (MVD)	
	COR (MC)	

Outras características	
ESPESSURA DA CORTIÇA (mm) (ESP)	DENSIDADE (aparente) (g/cm ³) (DA)

O critério de classificação das cortiças utilizado atribui uma pontuação geral a cada árvore, sempre penalizadora e, conseqüentemente, quanto mais alto for esse valor pior será a qualidade da cortiça. Como critério de separação de árvores em relação à qualidade da cortiça, consideram-se árvores produtoras de boa cortiça, quando os valores dessa pontuação geral são inferiores a 180, e árvores produtoras de má cortiça quando essa pontuação é superior. Com base neste limite, apresentam-se no quadro 7 os dois grupos de árvores.

Quadro 7 - Árvores produtoras de boa e má cortiça

Árvores produtoras de boa cortiça		Árvores produtoras de má cortiça	
Árvores	Pontuação total	Árvores	Pontuação total
A2	97	A3	220
A4	109	A5	323
A6	133	A7	201
A10	141	A8	213
A11	170	A9	285
A14	151	A12	194
A15	164	A13	208
A16	122	A17	262
A18	149	A19	295
A34	170	A20	275
A39	171	A21	320
A42	175	A22	330
A46	151	A23	182
A48	173	A24	190
A57	180	A25	242
A58	122	A26	267
A61	110	A35	203
A63	118	A36	345
A65	83	A37	327
A68	127	A40	216
A69	157	A43	215
		A44	251
		A45	278
		A47	230
		A49	212
		A50	252
		A51	182
		A52	287
		A53	185
		A54	201
		A55	235
		A56	329
		A59	216
		A60	356
		A62	183
		A64	260
		A66	329
		A67	294

6.2.2. Análise da morfologia por métodos de taxonomia numérica

Para a análise das características da cortiça recorreu-se igualmente aos métodos de taxonomia numérica, preparando-se previamente a matriz de dados, apresentada no anexo VIII, com 59 linhas correspondentes às árvores analisadas, e com 32 colunas relativas às características morfológicas da cortiça e sem valores omissos.

Na figura 19 apresenta-se o fenograma de distâncias obtido a partir dos dados standardizados. O coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,829, que indica que o fenograma é uma representação aceitável da respectiva matriz.

Da sua análise verificamos que as características morfológicas da cortiça não permitem separar as 59 árvores, não havendo portanto agrupamentos.

Na figura 20a representa-se a árvore de conexão mínima sobreposta à figura 20b que representa as projecções das 59 árvores no plano definido pela primeira e segunda componentes principais, com os valores da percentagem de variância total explicada por cada um dos eixos coordenados de 14,74 para a primeira, 13,34 para a segunda, e sendo a percentagem acumulada para as três primeiras componentes principais de 37,65, que se podem considerar um resumo bastante pobre da informação original.

Numa análise em conjunto podemos observar como as diferentes árvores se ligam entre si.

Assim, verificamos que as árvores A2 e A6 são dois núcleos de ligação muito próximos, estando a A2 ligada às árvores A10, A11, A15, A39, A40, A58, A61, A63, A68, e a árvore A6 ligada às árvores A12, A14, A23, A24 e A46.

Usando, como atrás indicado, o critério da qualidade da cortiça apresentado no quadro 7, verificamos que as árvores A12 (194), A23 (182) e A24 (190), embora já com uma pontuação total superior ao limite usado na classificação, se apresentam agrupadas com as árvores por nós consideradas de boa cortiça. Esta não concordância com o critério adoptado e os respectivos valores das suas pontuações parece indicar subjectividade na apreciação e ponderação de alguns caracteres utilizados na classificação usada na cortiça.

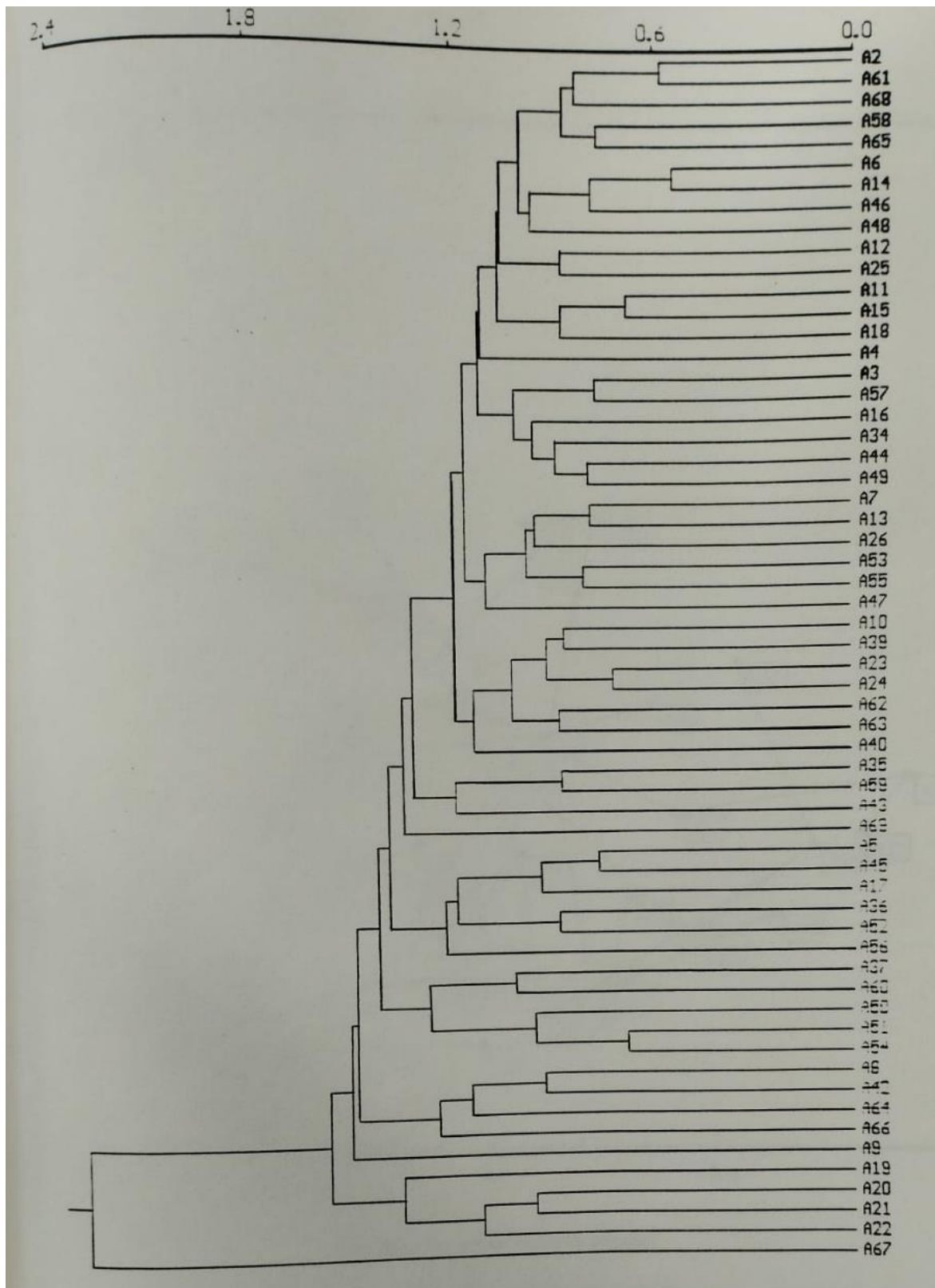


Fig. 19 - Fenograma das 59 árvores baseado no método UPGMA aplicado à matriz de distâncias (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,829$)

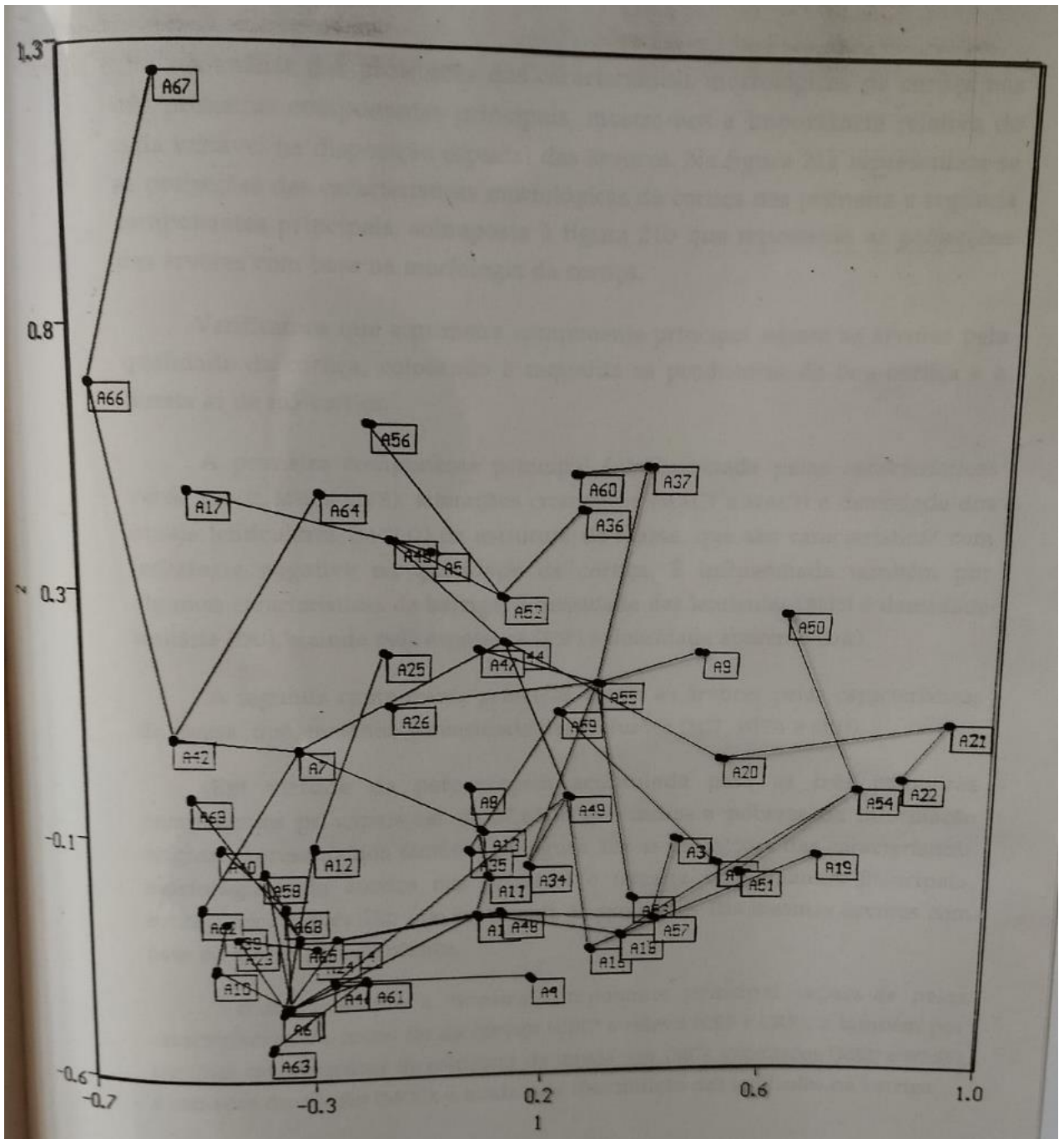


Fig. 20a - Árvore de conexão mínima

Fig. 20b- Projecção das 59 árvores no plano definido pela primeira componente principal (14,74%) e pela segunda componente principal (13,34%) com base nas características morfológicas da cortiça

A análise das projecções das características morfológicas da cortiça nas três primeiras componentes principais, mostra-nos a importância relativa de cada variável na disposição espacial das árvores. Na figura 21a representam-se as projecções das características morfológicas da cortiça nas primeira e segunda componentes principais, sobreposta à figura 21b que representa as projecções das árvores com base na morfologia da cortiça.

Verificamos que a primeira componente principal separa as árvores pela qualidade da cortiça, colocando à esquerda as produtoras de boa cortiça e à direita as de má cortiça.

A primeira componente principal é influenciada pelas características verde (MVD, MVI e MVE), alterações cromáticas (MACT e MACI) e densidade dos canais lenticulares (MCLD) da estrutura da massa, que são características com influência negativa na qualidade da cortiça. É influenciada também por algumas características da barriga, a densidade das lentículas (BLD) e densidade unitária (DU), e ainda pela espessura (ESP) e densidade aparente (DA).

A segunda componente principal separa as árvores pelas características da massa: tipo, tamanho e densidade das inclusões (MIT, MITA e MID).

Em virtude da percentagem acumulada para as três primeiras componentes principais ser de 37,65, o que indica a pobreza da informação original, apresentamos também na figura 22a as projecções das características morfológicas da cortiça nas primeira e terceira componentes principais, sobreposta à figura 22b que representa as projecções das mesmas árvores com base na morfologia da cortiça.

Verificamos que a terceira componente principal separa-as pelas características da costa: fio da cortiça (CFC) e relevo (CRF e CRE), e também por algumas características da estrutura da massa: cor (MC), expansões (MED e MESE) e camadas de criação (MCC), e ainda pela distribuição das lentículas na barriga.

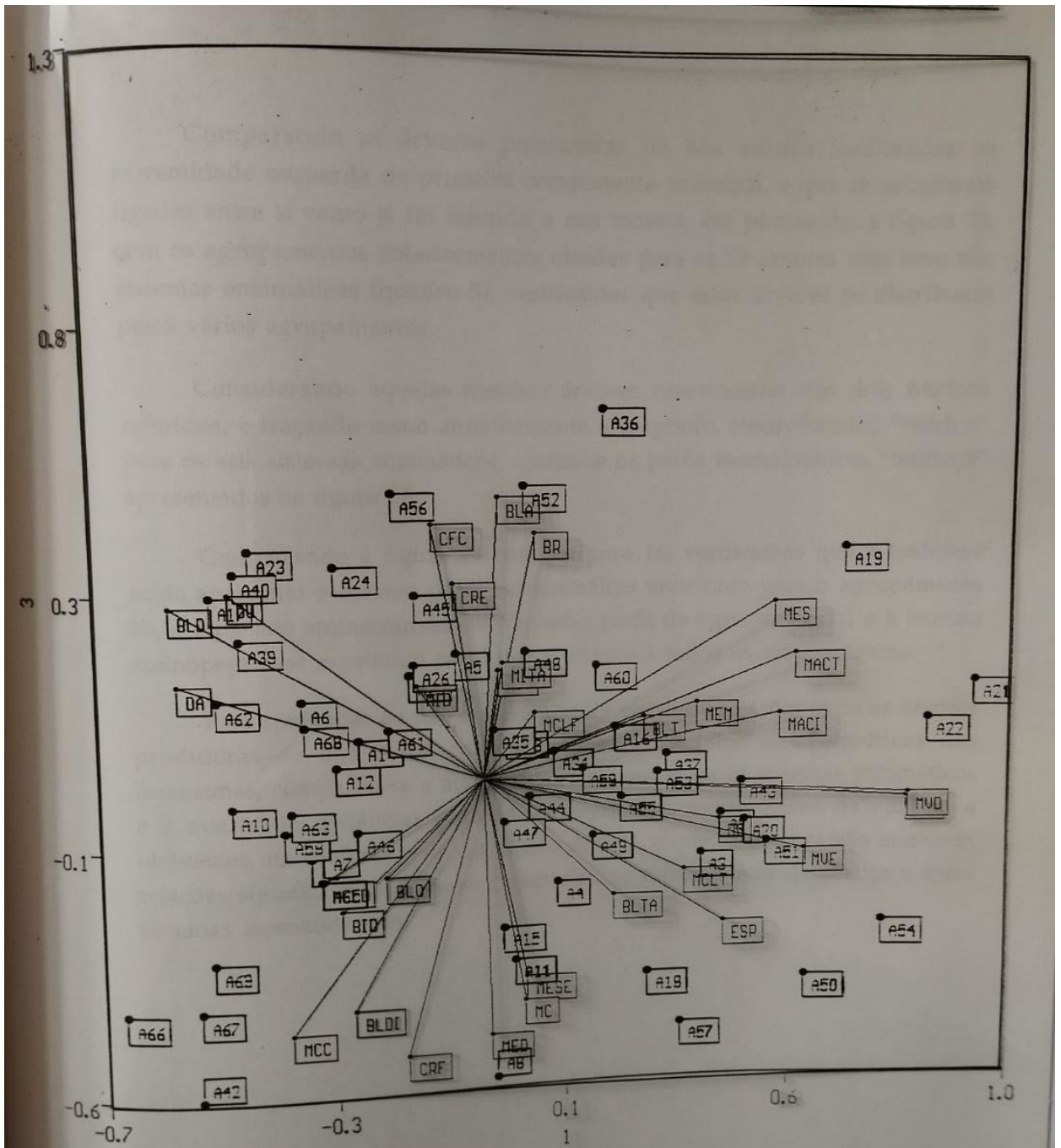


Fig. 22a - Projeções das 32 características morfológicas da cortiça, no plano definido pelas primeira e terceira componentes principais

Fig. 22b- Projeção das 59 árvores no plano definido pela primeira componente principal (14,74%) e pela terceira componente principal (9,56%) com base nas características morfológicas da cortiça

Comparando as árvores produtoras de boa cortiça localizadas na extremidade esquerda da primeira componente principal, e que se encontram ligadas entre si como já foi referido e nos mostra, em pormenor, a figura 23, com os agrupamentos anteriormente obtidos para as 59 árvores com base nos sistemas enzimáticos (quadro 5), verificamos que estas árvores se distribuem pelos vários agrupamentos.

Considerando aquelas mesmas árvores constituintes dos dois núcleos referidos, e traçando como anteriormente o diagrama electroforético “teórico” para os seis sistemas enzimáticos, obtêm-se os perfis isoenzimáticos “teóricos” apresentados na figura 24.

Comparando a figura 24 com a figura 16, verificamos que a fosfatase ácida apresenta o mesmo perfil isoenzimático verificado para o agrupamento 2b, a aspartato aminotransferase o mesmo perfil do agrupamento 1 e a leucina aminopeptidase mantém o perfil que é comum a todos os agrupamentos.

Para confirmar ou não a existência de possíveis relações entre as árvores produtoras de boa e má cortiça e os seus modelos electroforéticos das isoenzimas, comparou-se a matriz de semelhança para os sistemas enzimáticos e a matriz de distâncias para as características morfológicas da cortiça, e obtivemos um coeficiente de correlação de 0,03, o que demonstra não existirem relações significativas entre as características morfológicas da cortiça e estes sistemas isoenzimáticos.

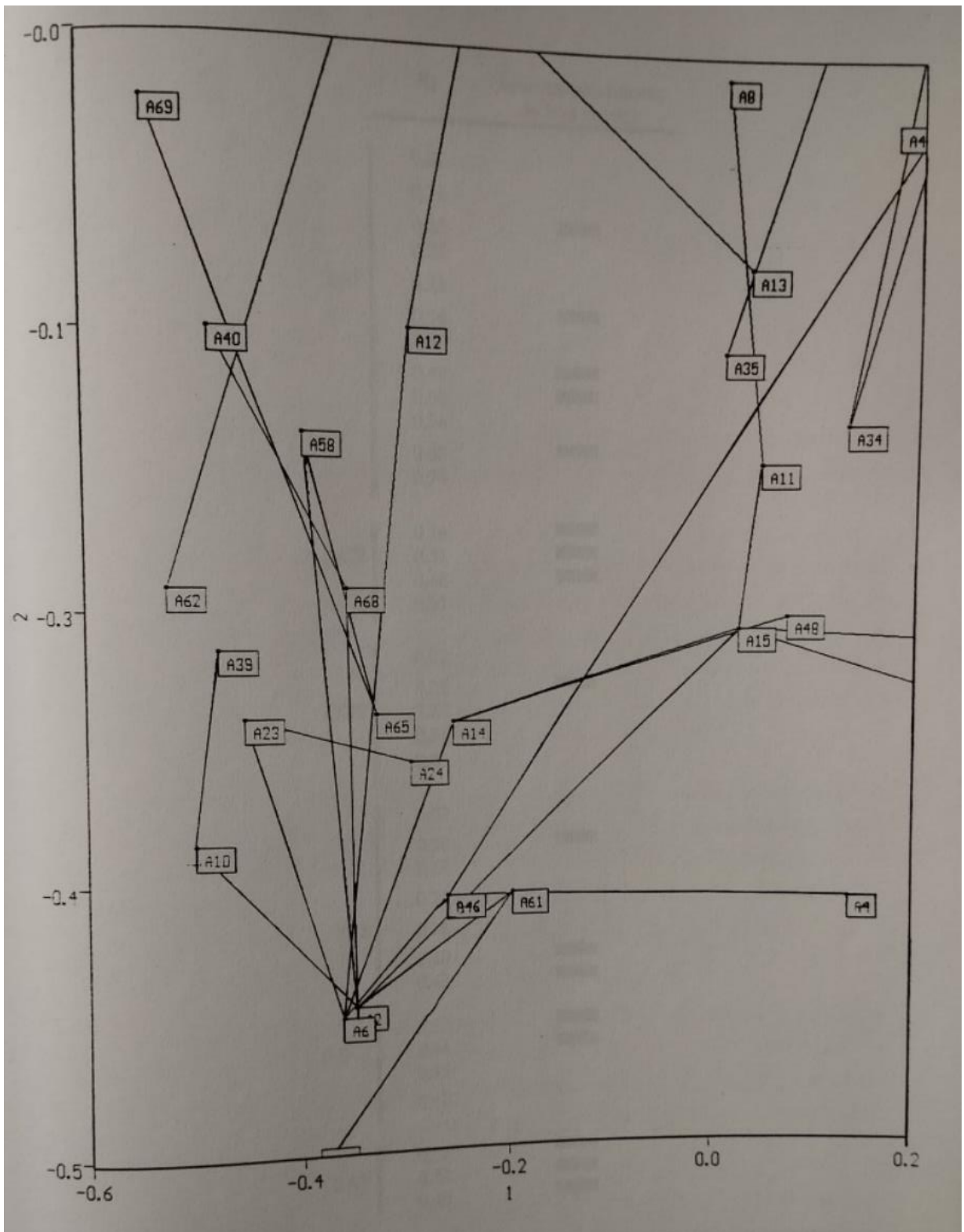


Fig. 23 - Projecções das árvores produtoras de boa cortiça localizadas na extremidade esquerda da primeira componente principal

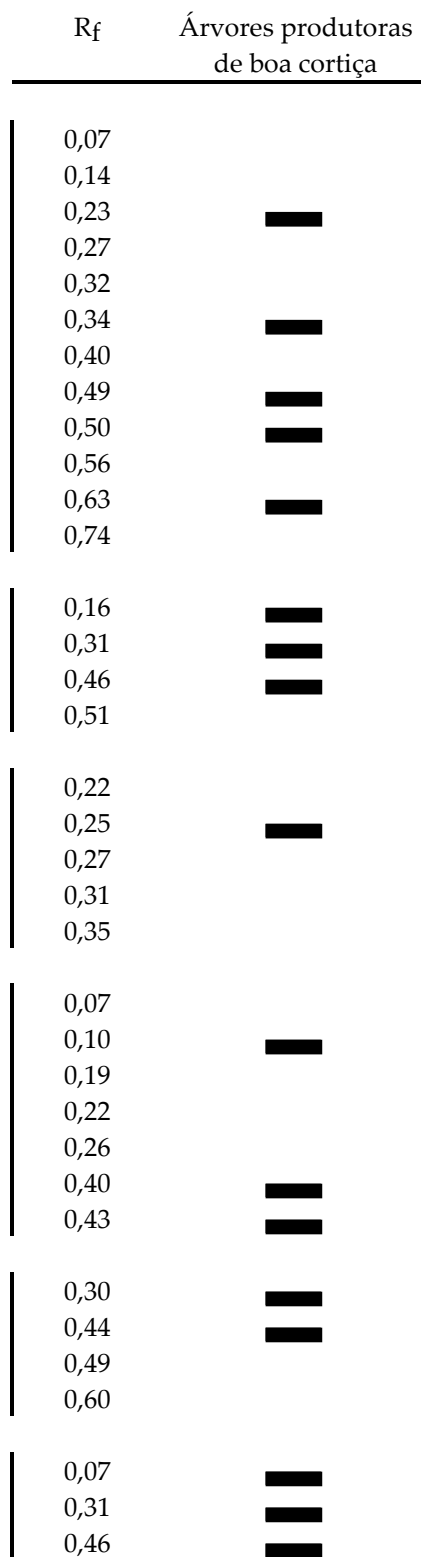


Fig. 24 - Diagrama electroforético “teórico” com base nos perfis izoenzimáticos das árvores que constituem o núcleo referido considerando-se uma frequência de 50% de presença das bandas.

7. Conclusões

Com este trabalho estamos a dar o nosso contributo para o aumento de conhecimento da variabilidade genética do sobreiro, através do polimorfismo isoenzimático.

Concluimos também que existe uma grande diversidade isoenzimática entre árvores e entre zonas de sobreiro, demonstrada pelos índices de polimorfismo e pela análise dos sistemas isoenzimáticos e das características da cortiça, por métodos de taxonomia numérica, e que estes sistemas enzimáticos não estão geneticamente correlacionados com a qualidade da cortiça, conforme era objectivo do nosso trabalho.

Operando os complexos processos e padrões de diferenciação das espécies vegetais em vários níveis, desde o nível molecular da mutação ao nível biológico da adaptação, não podemos referir nenhum deles como o mais importante, mas tentar aprofundar o conhecimento dos diversos aspectos da diferenciação, essencial para uma avaliação precisa do potencial evolutivo dum dado desenvolvimento.

Provavelmente pela complexidade dos fenómenos envolvidos, não foi possível detectar diferenças que permitissem distinguir indivíduos e populações, e estabelecer relações entre os indivíduos, através dos modelos electroforéticos das isoenzimas e a qualidade da cortiça, a serem possivelmente utilizadas como estratégia de selecção juvenil.

Alguns estudos realizados por diversos autores e referidos em URBANSKA (1987), mostram que não só o processo de reprodução é importante, mas também o fluxo génico, a flexibilidade fenotípica ou a localização, o que quer dizer que não há uma separação clara entre a genética, a ecologia e o comportamento da espécie, mas que é necessário que diversas áreas da ciência da vida sejam integradas.

Com o conhecimento dos elevados níveis de variação isoenzimática intravarietal encontrados no sobreiro, e outros resultados de investigação básica, devem ser tentadas novas linhas de trabalho de modo a podermos dar resposta a algumas questões:

- a combinação de dados morfofisiológicos e polimorfismo molecular para caracterizar a variabilidade genética das espécies florestais e fazer uma amostragem representativa de povoamentos para estabelecer uma rede de conservação, ou para constituir um núcleo de colecção de sementes;
- a selecção de locais e critérios para a conservação genética da espécie, de forma a conseguir-se uma representação da variação genética numa gama tão completa quanto possível, e também para assegurar a capacidade de resposta da espécie às modificações ambientais de modo a evitar a sua extinção;
- o tamanho efectivo da população para a espécie, e para uma unidade de conservação;
- os efeitos das práticas silvícolas na diversidade genética, em termos de evolução e condução de parcelas.

Não obstante a variabilidade intrapopulacional referida parecer garantia suficiente para potenciar o alcance de elevados ganhos genéticos num programa de melhoramento, os resultados obtidos aconselham, para desenvolvimento desse programa e para assegurar maiores ganhos genéticos potenciais, a introdução e estudo sistemático de sobreiros provenientes de outras origens dentro da área de distribuição da espécie e o estudo de ensaios de descendência.

Para aprofundar o conhecimento das relações propostas no objectivo deste trabalho, iniciámos já, através de técnicas de biologia molecular, a identificação e caracterização dos fragmentos de DNA, através de polimorfismos de dimensão de fragmentos de restrição (RFLP), que permitem a localização de regiões genómicas específicas possibilitando a identificação de marcadores genéticos, e consequentemente informação sobre os respectivos loci. Por comparação dos mapas de restrição estudaremos a sequência de nucleótidos em cada um dos fragmentos de restrição.

Os polimorfismos de dimensão de fragmentos de restrição são dos mais importantes marcadores genéticos, e apresentam vantagens distintas em relação a outros marcadores moleculares, considerando-se a mais importante o número potencialmente ilimitado de marcadores que podem ser detectados. Além disso, não variam com o tipo de tecido ou estádios de desenvolvimento da planta e não são afectados pela variação ambiental.

Os marcadores de DNA parecem pois ser mais apropriados para atingir este objectivo, uma vez que não são produtos dos genes, mas baseados na próprio DNA, ou seja, na própria informação genética (fenótipo = genótipo), fornecendo-nos informação acerca dos genes individuais.

8. Referências Bibliográficas

- ADAMS, W.T., 1983. Application of Isozymes in Tree Breeding. S.D. Tanksley, T.J. Orton (eds): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, (Part A). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 381-400.
- ADAMS, W.T., 1992. Gene Dispersal Within Forest Tree Populations. *New Forests* 6: 217-240.
- ANDERSON, J.W., 1968. Extraction of Enzymes and Subcellular Organelles from Plant Tissues. *Phytochemistry* 7: 1973-1988.
- ANDREWS, A.T., 1986. *Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*. Clarendon Press, Oxford.
- BAILEY, D.C., 1983. Isozymic Variation and Plant Breeders' Rights. S.D. Tanksley, T.J. Orton (eds): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, (Part A). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 425-440.
- BAYER, R.J., 1989. Patterns of Isozyme Variation in Western North American *Antennaria* (Asteraceae: inuleae). II. Diploid and Polymorphisms. *Genetics* 66: 133-145.
- BERGMANN, F., 1991. Isozyme Gene Markers. G. Müller-Starck, M. Ziehe (eds): *Genetic Variation in European Populations of Forest Trees*. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main, 67-77.
- BOROUGHS, 1954. (Cit. McMillin, 1983).
- BOUSQUET, J., LALONDE, M., 1991. The Population Genetics of Alder: An Overview. S. Fineschi, M.E. Malvolti, F. Cannata e H.H. Hattemer (eds): *Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*. SPB Academic Publishing by The Hague, The Netherlands, 105-112.
- BREWBAKER, J.L., 1971. Pollen Enzymes and Isozymes. J. Heslop-Harrison (ed): *Pollen: Development and Physiology*. Butterworths. London, 156-170.
- BROWN, A.H.D., 1978. Isozymes, Plant Population Genetic Structure and Genetic Conservation. *Theor. Appl. Genet.* 52: 145-157.
- BROWN, A.H.D., WEIR, B.S., 1983. Measuring Genetic Variability in Plant Populations. S.D. Tanksley, T.J. Orton (eds): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, (Part A). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 219-239.

- BRUNO DE SOUSA, R., 1983. Características das proteínas de reserva da tremocilha (*Lupinus luteus* L.). *Tese de Doutoramento*. ISA, Univ. Técn. Lisboa.
- BUTCHER, S.M., FOUNTAIN, D.W., 1987. Extraction of Protein from *Pinus* Tissue for Analysis by Electrophoretic and Serological Techniques. *New Zealand J. of Forestry Sci.* 17(1):121-128.
- CABRAL, F.M., 1990. Polimorfismo Enzimático em *Lupinus*. Identificação e Caracterização de populações (*L. albus* e *L. luteus* L.). *Tese de Doutoramento*. ISA, Univ. Técn. Lisboa.
- CARNEIRO, L.C., 1987. Aplicação de Métodos de Taxonomia Numérica à Ampelografia de *Vitis vinifera* L.. *Tese de Doutoramento*. ISA, Univ. Técn. Lisboa.
- CARVALHO, A., 1992. Relatório do Projecto Comunitário CAMAR - PL nº 900653 - "Melhoramento da Qualidade e Produtividade do Ecossistema do Sobreiro".
- CHECHOWITZ, N., CHAPPELL, D.M., GUTTMAN, S.I., WEIGT, L.A., 1990. Morphological, Electrophoretic, and Ecological Analysis of *Quercus macrocarpa* Populations in the Black Hills of South Dakota and Wyoming. *Canadian J. Botany* 68: 2185-2194.
- CHRAMBACH, A., RODBARD, D., 1971. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Science* 172: 440-451.
- CONKLE, M.T., HODGSKISS, P.D., NUNNALLY, L.B., HUNTER, S.C., 1982. Starch Gel Electrophoresis of Conifer Seeds: a Laboratory Manual. *Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Califórnia* 1-18.
- DAVIS, J.B., 1964. Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121: 404-427.
- DUNBAR, B.S., 1987. *Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*. Plenum Press, New York, London, 1-23.
- EIRAS-DIAS, J.E., 1984. O Polimorfismo Isoenzimático na Identificação de Cultivares de *Vitis vinifera* L.. *Tese de Doutoramento*. ISA. Univ. Técn. Lisboa.
- EL-KASSABY, Y.A., 1991. Genetic Variation Within and Among Conifer populations: Review and Evaluation of Methods. S. Fineschi, M.E. Malvolti, F. Cannata e H.H. Hattemer (eds): *Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*. SPB Academic Publishing bv The Hague, The Netherlands, 61-76.
- ELENA-ROSSELO, J.A., LUMARET, R., CABRERA, E., MICHAUD, H., 1992. Evidence for Hybridization Between Sympatric Holm-Oak and Cork-Oak in Spain Based on Diagnostic Enzyme Markers. *Vegetatio* 99-100: 115-118.

- ELLSTRAND, N.C., 1992. Gene Flow Among Seed Plant Populations. *New Forests* 6: 241-256.
- ERLENMEYER, 1874. (Cit. Stanley e Linskens, 1974).
- FERET, P.P., BERGMANN, F., 1976. Gel Electrophoresis of Proteins and Enzymes. J.P. Miksche (ed): *Modern Methods in Forest Genetics*. Springer-Verlag, New York, 49-77.
- GABRIEL, O., GERSTEN, D.M., 1992. Review: Staining for Enzymatic Activity after Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 203: 1-21.
- GOLDSTEIN, J.L., SWAIN, T., 1965. The Inhibition of Enzymes by Tannins. *Phytochemistry* 4: 185-192.
- GREEN, 1894. (Cit. Stanley e Linskens, 1974).
- GREGORIUS, H.R., BERGMANN, F., 1995. Analysis of Isoenzyme Genetic Profiles Observed in Forest Tree Populations. Ph. Baradat, W.T. Adams e G. Müller-Starck (eds): *Population Genetics and Genetic Conservation of Forest Trees*. SPB Academic Publishing, Amsterdam, 79-96.
- HAMES, B.D., 1990. One-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. B.D. Hames, D. Rickwood (eds): *Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical Approach*, IRL Press, New York, 1-147.
- HAMRICK, J.L., 1989. Isozymes and the Analysis of Genetic Structure in Plant Populations. Douglas E. Soltis, Pamela S. Soltis (eds): *Isozymes in Plant Biology*, Chapman e Hall, London, 87-105.
- HAMRICK, J.L., GODT, M.W., SHERMAN-BROYLES, S.L., 1992. Factors Influencing Levels of Genetic Diversity in Woody Plant Species. Mary L. Duryea (ed): *New Forests: Biology, Biotechnology, and Management of Afforestation and Reforestation*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 6: 95-124.
- HAMRICK, J.L., LINHART, Y.B., MITTON, J.B., 1979. Relationships Between Life History Characteristics and Electrophoretically Detectable Genetic Variation in Plants. *Annual Review Ecological Systematics* 10: 173 - 200.
- HESLOP-HARRISON, J., 1971. *Pollen: Development and Physiology*. London Butterworth.
- HUBBY, J.L., LEWONTIN, R.C., 1966. A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations. I. The Number of Alleles at Different Loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 577-94.

- HUNTER, R.L., MARKERT, C.L., 1957. Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels. *Science* 125: 1294-1295.
- INVENTÁRIO FLORESTAL NACIONAL - Portugal, 1988. Divisão de Estudos Económicos. Instituto de Produtos Florestais, Lisboa.
- JERMYN, M.A., 1952. (Cit. McMillin, 1983).
- JERMYN, M.A., THOMAS, R., 1954. (Cit. McMillin, 1983).
- KAMMANN, 1912. (Cit. Stanley e Linskens, 1974).
- KELLEY, W.A., ADAMS, R.P., 1977. Preparation of Extracts from Juniper Leaves for Electrophoresis. *Phytochemistry* 16: 513-516.
- KIM, Z.S., LEE, S.W., HYUN, J.O., 1993. Allozyme Variation in 6 Native Oak Species in Korea. *Annales des Sciences Forestières* 50 (Suppl 1): 253s-260s.
- KNOX, R.B., HESLOP-HARRISON, J., 1969, 1971a, 1971b, 1971c, 1973. (Cit. Mascarenhas, 1975)
- KNOX, R.B., HESLOP-HARRISON, J., 1970. Pollen-Wall Proteins: Localization and Enzymic Activity. *J. Cell Science* 6: 1-27.
- KNOX, R.B., HESLOP-HARRISON, J., 1971. Pollen-Wall Proteins: Electron Microscopic Localization of Acid Phosphatase in the Intine of *Crocus vernus*. *J. Cell Science* 8: 727-733.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage 4. *Nature* 227: 680-685 (Cit. Cabral, 1990).
- LEWONTIN, R.C., 1973. Population Genetics. *Annual Review of Genetics* 7: 1-17.
- LOOMIS, W.D., BATTAILE, J., 1966. Plant Phenolic Compounds and the Isolation of Plant Enzymes. *Phytochemistry* 5: 423-438.
- LUMARET, R., YACINE, A., BERROD, A., ROMANE, F., LI, T.X., 1991. Mating System and Genetic Diversity in Holm Oak (*Quercus ilex* L. Fagaceae). S. Fineschi, M.E. Malvolti, F. Cannata e H.H. Hattemer (eds): *Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands, 149-153.
- MÄKINEN, Y., BREWBAKER, J.L., 1967. Isoenzyme Polymorphism in Flowering Plants. I. Diffusion of Enzymes Out of Intact Pollen Grains. *Physiologia Plantarum* 20: 477- 482.
- MÄKINEN, Y., MACDONALD, T., 1968. Isoenzyme Polymorphism in Flowering Plants. II. Pollen Enzymes and Isozymes. *Physiologia Plantarum* 21: 477-486.

- MARKERT, C.L., HUNTER, R.L., 1959. The distribution of Esterases in Mouse Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 7: 42-49 (Cit. Cabral, 1990).
- MARKERT, C.L., MOLLER, F., 1959. Multiple Forms of Enzymes: Tissue, Ontogenetic, and Species Specific Patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 45: 753-763.
- MARKERT, C.L., SHAKLEE, J.B., WHITT, G.S., 1975. Evolution of a Gene. *Science* 189: 102-114.
- MARKERT, C.L., WHITT, G.S., 1968. Molecular Varieties of Isozymes. *Experientia* 24 (10): 977-1088.
- MARSHALL, D.R., ALLARD, R.W., 1970. Isozyme Polymorphisms in Natural Populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. *Heredity* 57: 373-382.
- MARSHALL, D.R., JAIN, S.K., 1969. Genetic Polymorphism in Natural Populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. *Nature* 221: 276-278.
- MARTY, T.L., O'MALLEY, D.M., GURIES, R.P., 1984. A Manual for Starch Gel Electrophoresis: New Microwave Edition. *College of Agricultural and Life Sciences, University of Wisconsin-Madison*.
- MASCARENHAS, J.P., 1975. The Biochemistry of Angiosperm Pollen Development. *The Botanical Review* 41: 259-314.
- MCCOWN, B.H., HALL, T.C., BECK, G.E., 1969. Plant Leaf and Stem Proteins. II. Isozymes and Environmental Change. *Plant Physiol.* 44: 210-216.
- MCMILLIN, D.E., 1983. Plant Isozymes: A Historical Perspective. S.D. Tanksley, T.J. Orton (eds): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, (Part A). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 3-13.
- MOORE, G.A., COLLINS, G.B., 1983. New Challenges Confronting Plant Breeders. S.D. Tanksley, T.J. Orton (eds): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, (Part A). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 25-58.
- MORAN, G.F., 1992. Patterns of Genetic Diversity in Australian Tree Species. Mary L. Duryea (ed): *New Forests: Biology, Biotechnology, and Management of Afforestation and Reforestation*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 6: 49-66.
- MÜLLER-STARCK, G., BARADAT, Ph., BERGMANN, F., 1992. Genetic Variation Within European Tree Species. Mary L. Duryea (ed): *New Forests: Biology, Biotechnology, and Management of Afforestation and Reforestation*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 6: 23-47.

- MÜLLER-STARCK, G., HERZOG, S., HATTEMER, H.H., 1993. Intra- and Interpopulational Genetic Variation in Juvenile Populations of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. *Annales des Sciences Forestières* 50 (Suppl 1): 233s-244s.
- NATIVIDADE, J. V., 1950. *Subericultura*. Lisboa
- NEALE, D.B., WEBER, J.C., ADAMS, W.T., 1984. Inheritance of Needle Tissue Isozymes in Douglas-fir. *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 459-468.
- NEI, M., 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3321-3323.
- NÓBREGA, F., 1990. Estudo Proteico e enzimático do Sobreiro (*Quercus suber* L.). *Relatório para as Provas de Progresso na Carreira de Investigação Científica*. EFN, Lisboa.
- NÓBREGA, F., 1992. Polimorfismo Isoenzimático do Sobreiro. In *Actas do II Congresso sobre Montados de Sobre e de Azinho*, Junho, Évora.
- NÓBREGA, F., ROLO, J., BRUNO DE SOUSA, R., 1990. Identificação de Isoenzimas em Pólen de Sobreiro. *Poster apresentado no II Congresso Florestal Nacional*, Novembro, Porto.
- ORNSTEIN, L., 1964. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Annals New York Academy of Sciences* 321-349.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, F., CATALAN, J., BRITTON-DAVIDIAN, J., 1988. *Practical Isozyme Genetics*. Ellis Horwood Limited.
- PEIRCE, L.C., BREWBAKER, J.L., 1973. Applications of Isozyme Analysis in Horticultural Science. *Hort. Science* 8(1): 17-22.
- ROHLF, F.J., 1992. *NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (VER 1.7). Exeter Software. Setanket, New York.
- ROSEN, W.G., 1968. Ultrastructure and Physiology of pollen. *Annual Review Plant Physiology* 19, 435-462.
- SCANDALIOS, J.G., 1969. Genetic Control of Multiple Molecular Forms of Enzymes in Plants: a Review. *Biochem. Genetics* 3: 37-79 (Cit. Cabral, 1990).
- SCHWARTZ, M.K., *et al.*, 1963. (Cit. Cabral, 1990).
- SERVIÇO TÉCNICO, 1975. Evolução dos Preços no Mato das Cortiças Amadias (1971 a 1974). *Boletim do Instituto dos Produtos Florestais - Cortiça* 436: 24-26.
- SHANNON, L.M., 1968. Plant Isozymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 19: 187-210.

- SHAW, C.R., 1965. Electrophoretic Variation in Enzymes. *Science* 149: 936-943.
- SHAW, C.R., 1969. Isozymes: Classification, Frequency, and Significance. *International Review of Cytology* 25: 297-331.
- SHEEN, S.J., CALVERT, J., 1969. Studies on Polyphenol Content, Activities and Isozymes of Polyphenol Oxidase and Peroxidase During Air-Curing in Three Tobacco Types. *Plant Physiol.* 44: 199-204.
- SHELDON, I.G., WEIGHT, L.A., 1989. Electrophoretic Evidence of Relationships Among *Quercus* (oaks) of Eastern North America. *Can. J. Bot.* 67: 339-351.
- SINGH, R.S., JAIN, S.K., QUALSET, C.O., 1973. Protein Electrophoresis as an Aid to Oat Variety Identification. *Euphytica* 22: 98-105.
- SMITHIES, O., 1955. Zone Electrophoresis in Starch Gels. *Biochem. J.* 61: 629.
- SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R., 1973. (Cit. Carneiro, 1987).
- SOKAL, R.R., MICHENER, C.D., 1958. (Cit. Carneiro, 1987).
- SOKAL, R.R., ROHLF, F.J., 1962. (Cit. Carneiro, 1987).
- STANLEY, R.G., LINSKENS, H.F., 1974. *Pollen: Biology, Biochemistry, Management*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 193-222.
- STRASBURGER, 1886. (Cit. Stanley e Linskens, 1974).
- TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J., 1983. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Part B. Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam.
- TORRES, A.M., DIEDENHOFEN, U., BERGH, B.O., KNIGHT, R.J., 1978. Enzyme Polymorphisms as Genetic Markers in the Avocado. *American J. Botany* 65(2): 134-139.
- URBANSKA, K.A., 1987. *Differentiation Patterns in Higher Plants*. Academic Press, London.
- VAN TIEGHEM, 1869. (Cit. Stanley e Linskens, 1974).
- VASIL, I.K., 1973. The New Biology of Pollen. *Naturwissenschaften* 60: 247-253.
- WEEDEN, N.F., 1983. Evolution of Plant Isozymes. S.D. Tanksley, T.J. Orton (eds): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, (Part A). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 175-205.

- WEEDEN, N.F., GOTTLIEB, L.D., 1980. Isolation of Cytoplasmic Enzymes from Pollen. *Plant Physiology* 66: 400-403.
- WENDEL, J.F., WEEDEN, N.F., 1989. Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. Douglas E. Soltis, Pamela S. Soltis (eds): *Isozymes in Plant Biology*. Chapman e Hall, London, 5-45.
- WERNER, D.J., SINK, K.C., 1977. Identification of Poinsettia Cultivars by Electrophoretic Analysis of Proteins and Peroxidases. *J. Hered.* 68: 35-40.
- YACINE, A., LUMARET, A., 1989. Genetic Diversity in Holm-Oak (*Quercus ilex* L.): Insight from Several Enzyme markers. *Silvae Genetica* 38: 3-4.

ANEXO I

Critério de pontuação ponderada utilizado na classificação e ordenamento qualitativo dos diferentes sobreiros

PARTICULARIDADES DA BARRIGA

COR

clara (amarelada)	0 pontos
amarela-dourada	5 "
escura (acastanhada)	10 "

Relevo

Acidentado geral:

suave e uniforme	0 "
uniforme e medianamente acidentado	5 "
desigual e acidentado	10 "
muito acidentado	15 "

Lentículas (porosidade)

Tipo

circulares e planas

sem lábios evidentes	0 "
com lábios evidentes	
direitos	5 "
revirados	10 "

circulares salientes

com lábios abertos e revirados (bofe)	40 "
com lábios fechados retraídos (frouxa)	30 "

elípticas pouco salientes (se pouco numerosas, adaptar redução)

com lábios abertos direitos	20 ou 10 “
com lábios abertos revirados	25 ou 15 “
circulares deprimidas	30 pontos
elípticas com forte projecção exterior	
com inclusões duras (preguentas)	40 “
sem inclusões (frouxas)	30 “
Tamanho e Variação	
Pequenas	10 “
médias	20 “
grandes	30 “
muito grandes	40 “
Agregação	
Sobretudo solitárias	0 “
Por vezes agregadas e coalescentes	10 “
Frequentemente agregadas e confluentes	20 “
Oclusão	
Moles (pulverulentas)	0 “
Duras (esclerosas)	10 “
Densidade	
Baixa (pouco numerosas)	0 “
Média (numerosas)	15 “
Alta (muito numerosas)	30 “

Distribuição

Uniforme	0 "
Pouco Desigual	10 "
Muito Desigual	20 "

INCRUSTAÇÕES

Presença-tipo

Ausentes	0 pontos
Esclerosas	5 "
Pregosas	10 "
Superficiais	15 "
Profundas	20 "

Tamanho

Pequenas	0 "
Médias	5 "
Grandes	10 "

Densidade

Pouco numerosas	0 "
Numerosas	5 "
Muito numerosas	10 "

ESTRUTURA DA MASSA

INCLUSÕES

Presença-tipo

Ausentes	0 "
----------	-----

Preguentas 10 “

Madeirentas 10 “

Preguentas e madeirentas 20 “

Tamanho

Pequenas 5 “

Médias 20 “

Grandes 35 pontos

Densidade

Pouco numerosas 5 “

Numerosas 25 “

Muito numerosas 45 “

CANAIS LENTICULARES

Forma

Direitos 0 “

Cónicos 10 “

Tamanho

Finos 0 “

Médios 15 “

Largos 30 “

Densidade

Pouco numerosos 0 “

Numerosos 10 “

Muito numerosos 20 “

Espasmos (=expansões)		
	Solitários	0 "
	Seriados	5 "
	Multianelares	20 "

Tamanho		
	Pequenos	5 "
	Médios	10 pontos
	Grandes	25 "
	Muito grandes	40 "

Densidade		
	Pouco numerosos	5 "
	Numerosos	20 "
	Muito numerosos	35 "

Nota: Para cada um dos tipos e tamanhos, bem como para a ocorrência relativa (proporção), somar tipo+tamanho e determinar percentagens.

CAMADAS DE CRIAÇÃO

Definição		
	Distintas mas indefinidas	0 "
	Distintas mas definidas	2 "
	Distintas mas muito definidas	5 "

Regularidade da largura		
	Regular	0 "
	Irregular	5 "

Ondulação de contorno

Liso	0 "
Ondulado	5 "
Sinuoso (com "picos")	10 "

ALTERAÇÕES CROMÁTICAS

Tipo (cor)

Indistinto	0 "
Marmoreado	5 pontos
Manchado	10 "

Intensidade (da cor)

Fraca	0 "
Media	5 "
Forte	10 "

Extensão (superficial)

Pequena (vestigios)	0 "
Media	5 "
Grande	10 "

VERDE

Intensidade (deformação)

Indistinto	0 "
Distinto	10 "

Muito distinto	20 “
----------------	------

Extensão (superficial)

Fraca	5 “
-------	-----

Media	20 “
-------	------

Forte	35 “
-------	------

Distribuição (articular com extensão fraca)

Pequena	0 ou 5 “
---------	----------

Media	5 ou 20 “
-------	-----------

Grande	10 ou 35 “
--------	------------

LINHA DA BARRIGA

Lisa	0 “
------	-----

Ondulada	5 “
----------	-----

Sinuosa (com “picos”)	10 “
-----------------------	------

COR

Clara	0 “
-------	-----

Media	5 “
-------	-----

Intensa	10 “
---------	------

PARTICULARIDADE DA COSTA

RELEVO

Em depressão (fendimento)

Intensidade-tipo

Fendida	10 “
---------	------

Rachada	20 “
Gretada	25 “
Enguiada	30 “

Picado-intensidade

Fraca	5 “
Média	15 “
Forte	25 “

Necrosado-intensidade

Fraca	5 “
Média	15 “
Forte	25 “

Em elevação (granitado)

Tipo

Cristado	20 pontos
Vulcanado	10 “

Intensidade

Fraca	15 “
Média	25 “
Forte	35 “

FIO DA CORTIÇA

Inclinação do fio

Fraca (< 5/100)	0 “
-----------------	-----

Média (5-15/100)	10 “
Forte (> 15/100)	20 “

OUTRAS CARACTERÍSTICAS

ESPESSURA DA CORTIÇA

Delgadinha (< 22 mm)	0 “
Delgada (22-27 mm)	10 “
Meia marca (27-32 mm)	30 “
Marca (32-40 mm)	30 “
Grossa (40-54 mm)	30 “
Triângulo (> 54 mm)	30 “

DENSIDADE (aparente)

Excessivamente leve (bofe ou frouxa: < 0,150)	10 “
Leve (algo frouxa: 0,150-0,200)	10 pontos
Normal (0,200-0,250)	20 “
Pesada (preguenta ou madeirenta: 0,250-0,300)	10 “
Muito pesada (preguenta e madeirenta: > 0,300)	20 “

DEFEITOS ACIDENTAIS

Tipo	
Cortiça cobrilhada	20 “
Cortiça formigada	20 “
Cortiça picada	20 “
Cortiça folhada	5 “
Cortiça preguenta	5 “

Intensidade (só aplicável na classificação da prancha)

Forte	20 "
Média	10 "
Fraca	5 "

ANEXO II

Soluções tampão e aditivos para a extração das isoenzimas em folhas

Métodos	Solução tampão	Aditivos
NEALE, WEBER e ADAMS, 1984	Fosfato de potássio 0,16M pH 6,8	Amberlite XAD-4 Dióxido de germânio Borato de sódio DIECA PVP-40 Ascorbato de sódio Dimetil sulfóxido
MARTY, O'MALLEY e GURIES, 1984	Fosfato de sódio 0,04M pH 7,3	Sacarose EDTA Ácido ascórbico Bissulfito de sódio DIECA PVP-40 2- Mercaptoetanol Albumina
BUTCHER e Fountain, 1987	Água destilada	PVP insolúvel Ácido ascórbico 2-Mercaptoetanol
YACINE e LUMARET, 1989	Tris / HCl 0,1M pH 7,6	PVP insolúvel
BAYER, 1989	Tris / HCl 0,1M pH 7,5	2-Mercaptoetanol EDTA Cloreto de potássio Cloreto de magnésio PVP insolúvel
CABRAL, 1990	Tris / HCl 0,1M pH 7,5	PVP insolúvel Tioglicolato de sódio Metabissulfito de potássio

ANEXO III

Soluções tampão e aditivos para a extracção das isoenzimas em pólen

Métodos	Solução tampão	Aditivos
WEEDEN e GOTTLIEB, 1980	Tris/HCl 50 mM pH 8,0	EDTA 2-Mercaptoetanol
BAYER, 1989	Tris/HCl 0,1 M pH 7,5	2-Mercaptoetanol EDTA Cloreto de potássio Cloreto de magnésio PVP insolúvel
WENDEL e WEEDEN, 1989	Tris/HCl 50 mM pH 7,5	Sacarose 2-Mercaptoetanol

ANEXO IV

Sistemas de revelação dos sistemas enzimáticos

Sistema enzimático	Tampão de revelação	Aditivos
α,β -Carboxilesterases (CONCKLE <i>et al.</i> , 1982)	Tris/HCl 0,08M pH 7,0	Acetato de α -naftilo Acetato de β -naftilo Acetona Fast blue RR salt
Fosfatase ácida (MARKERT e HUNTER, 1959)	Acetato pH 4,0	Fosfato ácido de α -naftilo Fast Garnet GBC salt Cloreto de Magnésio
Aspartato aminotransferase (SCHWARTZ <i>et al.</i> , 1963)	Tris/HCl 0,2M pH 8,0	EDTA Ácido α -cetoglutárico Ácido L-aspártico Piridoxal-5-fosfato Fast blue BB salt
Fosfoglucose isomerase (CONCKLE <i>et al.</i> , 1982)	Tris/HCl 0,05M pH 8,0	D-frutose-6-fosfato NADP, NBT, PMS Glucose-6-fosfato desidrogenase Cloreto de magnésio
Álcool desidrogenase (CONCKLE <i>et al.</i> , 1982)	Tris/HCl 0,05M pH 8,0	NAD, NBT, PMS Álcool etílico 95%
Leucina aminopeptidase (CONCKLE <i>et al.</i> , 1982)	Tris / málico 0,02M pH 5,2	Ácido bórico Cloreto de magnésio L-leucil- β - naftilamida. HCl Fast black K salt

ANEXO V

Quadro 1- Registo do zimograma referente ao Sistema enzimático das α , β - Carboxilesterases

Parcela -Árvore	Rf	0,07	0,14	0,18	0,23	0,27	0,32	0,34	0,40	0,44	0,49	0,50	0,56	0,63	0,74	0,80
4/10-A1		0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
5/6A-A2		0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
5/6A-A3		0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
5/6A-A4		0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
5/7A-A5		0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
5/7A-A6		0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
5/9-A7		0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
5/9-A8		0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
6/7-A9		0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
6/7-A10		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
6/7-A11		0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
6/7-A12		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
6/7-A13		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
6/7-A14		0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
6/7-A15		0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
6/8-A16		0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
6/8-A17		0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
6/8-A18		0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
7/7-A19		1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
7/7-A20		0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
7/7-A21		0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
7/7-A22		1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
7/8A-A23		0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
7/8A-A24		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
7/8A-A25		0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
7/8A-A26		1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
8/6-A27		0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
8/6-A28		1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
8/6-A29		1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
8/6-A30		0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
8/6-A31		1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
8/6-A32		1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
8/6-A33		1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
8/7-A34		0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
8/7-A35		0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
8/8-A36		1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
8/8-A37		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
8/11-A38		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
9/4-A39		1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
9/4-A40		1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
9/4-A41		1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
9/4-A42		1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
9/5-A43		1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
9/6-A44		0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
9/6-A45		0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
9/6-A46		0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
9/6-A47		0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
9/6-A48		1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
9/6-A49		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
10/5-A50		0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
10/10-A51		0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
10/10-A52		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
10/10-A53		0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
10/10-A54		1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
10/10-A55		1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
10/10-A56		1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
10/10-A57		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
10/10-A58		1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
10/10-A59		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
12/4-A60		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
13/5-A61		1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
13/5-A62		0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
17/5-A63		0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Chaminé-A64		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Chamusca- A65		1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
João Galego-A66		0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
V. Pocinho-A67		0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
V. Pocinho-A68		0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
V. Pocinho-A69		0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

Quadro 2 – Registo do zimograma referente ao sistema enzimático fosfatase ácida

Rf	0,07	0,10	0,13	0,16	0,22	0,31	0,34	0,40	0,46	0,51	0,60
Parcela -Árvore											
4/10-A1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
5/6A-A2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
5/6A-A3	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
5/6A-A4	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
5/7A-A5	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
5/7A-A6	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
5/9-A7	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
5/9-A8	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
6/7-A9	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
6/7-A10	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
6/7-A11	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
6/7-A12	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
6/7-A13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
6/7-A14	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
6/7-A15	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
6/8-A16	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
6/8-A17	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
6/8-A18	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
7/7-A19	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
7/7-A20	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
7/7-A21	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
7/7-A22	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
7/8A-A23	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
7/8A-A24	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
7/8A-A25	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
7/8A-A26	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
8/6-A27	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
8/6-A28	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
8/6-A29	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
8/6-A30	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
8/6-A31	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
8/6-A32	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
8/6-A33	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
8/7-A34	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
8/7-A35	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
8/8-A36	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
8/8-A37	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
8/11-A38	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
9/4-A39	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
9/4-A40	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
9/4-A41	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
9/4-A42	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
9/5-A43	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
9/6-A44	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
9/6-A45	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
9/6-A46	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
9/6-A47	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
9/6-A48	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
9/6-A49	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
10/5-A50	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
10/10-A51	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
10/10-A52	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
10/10-A53	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
10/10-A54	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
10/10-A55	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
10/10-A56	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
10/10-A57	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
10/10-A58	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
10/10-A59	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
12/4-A60	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
13/5-A61	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
13/5-A62	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
17/5-A63	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
Chaminé-A64	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
Chamusca- A65	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
João Galego-A66	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
V.Pocinho-A67	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
V.Pocinho-A68	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
V.Pocinho-A69	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1

Quadro 3- Registo do zimograma referente ao sistema enzimático aspartate aminotransferase

Parcela -Árvore	Rf	0,20	0,22	0,25	0,27	0,31	0,34	0,35	0,38	0,41
4/10-A1		0	0	1	0	0	0	0	0	1
5/6A-A2		0	0	1	0	0	0	0	0	1
5/6A-A3		0	0	1	0	0	0	1	0	0
5/6A-A4		0	0	0	1	0	0	0	1	0
5/7A-A5		0	1	0	0	0	1	0	0	0
5/7A-A6		0	0	1	0	0	0	0	1	0
5/9-A7		0	0	1	0	0	0	0	0	1
5/9-A8		0	0	0	1	0	0	0	0	1
6/7-A9		0	1	0	0	0	0	0	0	0
6/7-A10		0	1	0	0	0	1	0	0	0
6/7-A11		0	0	0	1	0	0	0	0	1
6/7-A12		1	0	0	0	0	0	1	0	0
6/7-A13		0	0	1	0	1	0	0	0	0
6/7-A14		0	0	1	0	0	0	1	0	0
6/7-A15		0	0	1	0	0	0	0	1	0
6/8-A16		0	0	1	0	0	0	0	0	1
6/8-A17		0	0	1	0	0	0	1	0	0
6/8-A18		1	0	0	0	0	0	1	0	0
7/7-A19		0	0	0	1	0	0	1	0	0
7/7-A20		1	0	0	1	0	0	0	1	0
7/7-A21		0	0	1	0	0	0	0	1	0
7/7-A22		0	0	1	0	1	0	1	0	0
7/8A-A23		0	0	0	1	0	0	1	0	0
7/8A-A24		0	1	0	0	0	0	1	0	0
7/8A-A25		0	0	1	0	0	0	1	0	0
7/8A-A26		0	1	0	0	0	0	1	0	1
8/6-A27		0	0	1	0	0	0	1	0	0
8/6-A28		0	0	1	0	1	0	0	0	0
8/6-A29		0	0	1	0	0	1	1	0	0
8/6-A30		0	0	1	0	1	0	1	0	0
8/6-A31		0	1	0	0	0	0	0	0	1
8/6-A32		1	0	0	0	0	1	0	0	0
8/6-A33		0	0	0	1	0	0	0	0	1
8/7-A34		0	0	1	0	0	0	1	0	0
8/7-A35		1	0	0	0	0	1	0	0	0
8/8-A36		0	0	1	0	1	0	1	0	0
8/8-A37		0	0	1	0	1	0	0	0	0
8/11-A38		0	0	1	0	1	0	0	0	0
9/4-A39		0	1	0	1	0	0	1	0	0
9/4-A40		0	1	0	0	1	0	1	0	0
9/4-A41		0	1	0	0	1	0	1	0	0
9/4-A42		1	0	0	0	1	0	0	1	0
9/5-A43		0	0	1	0	0	0	1	0	0
9/6-A44		0	0	1	0	0	0	0	0	1
9/6-A45		0	0	1	0	0	0	0	0	1
9/6-A46		0	1	0	0	0	0	0	1	0
9/6-A47		0	1	0	0	0	1	0	0	0
9/6-A48		0	0	1	0	0	1	0	1	0
9/6-A49		0	1	0	0	1	0	0	0	0
10/5-A50		0	0	1	0	1	0	0	0	0
10/10-A51		0	0	1	0	0	1	0	0	1
10/10-A52		0	0	1	0	1	0	1	0	0
10/10-A53		0	1	0	0	0	0	1	0	0
10/10-A54		0	0	1	0	1	0	1	0	0
10/10-A55		0	0	1	0	1	0	0	0	0
10/10-A56		0	0	1	0	1	0	0	0	0
10/10-A57		0	1	0	0	0	0	1	0	0
10/10-A58		0	0	1	0	1	0	0	0	0
10/10-A59		0	0	0	0	1	0	0	0	0
12/4-A60		0	1	0	0	1	0	0	0	0
13/5-A61		0	0	1	0	1	0	1	0	0
13/5-A62		0	0	1	0	1	0	0	0	0
17/5-A63		0	0	1	1	1	0	0	0	0
Chaminé-A64		0	0	0	1	1	0	1	0	0
Chamusca-A65		0	0	1	1	1	0	1	1	1
João Galego-A66		0	0	0	0	1	0	0	0	0
V.Pocinho-A67		0	0	1	1	1	0	0	0	0
V.Pocinho-A68		0	0	1	0	1	0	0	0	0
V.Pocinho-A69		0	0	1	0	0	0	1	0	0

Quadro 4- Registo do zimograma referente ao sistema enzimático
fosfoglucose isomerase

Parcela -Árvore	Rf	0,07	0,10	0,14	0,19	0,22	0,26	0,29	0,40	0,43	0,55	0,66
4/10-A1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5/6A-A2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
5/6A-A3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5/6A-A4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5/7A-A5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
5/7A-A6	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5/9-A7	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5/9-A8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6/7-A9	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
6/7-A10	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
6/7-A11	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6/7-A12	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
6/7-A13	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
6/7-A14	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6/7-A15	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
6/8-A16	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6/8-A17	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6/8-A18	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
7/7-A19	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
7/7-A20	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
7/7-A21	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
7/7-A22	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
7/8A-A23	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
7/8A-A24	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
7/8A-A25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
7/8A-A26	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
8/6-A27	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
8/6-A28	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8/6-A29	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
8/6-A30	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8/6-A31	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
8/6-A32	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0
8/6-A33	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
8/7-A34	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
8/7-A35	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8/8-A36	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8/8-A37	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
8/11-A38	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
9/4-A39	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
9/4-A40	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
9/4-A41	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
9/4-A42	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
9/5-A43	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
9/6-A44	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
9/6-A45	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
9/6-A46	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
9/6-A47	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
9/6-A48	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
9/6-A49	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
10/5-A50	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
10/10-A51	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
10/10-A52	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
10/10-A53	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
10/10-A54	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
10/10-A55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
10/10-A56	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
10/10-A57	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
10/10-A58	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
10/10-A59	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
12/4-A60	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
13/5-A61	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
13/5-A62	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
17/5-A63	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Chaminé-A64	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
Chamusca-A65	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
João Galego-A66	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
V.Pocinho-A67	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
V.Pocinho-A68	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
V.Pocinho-A69	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Quadro 5- Registo do zimograma referente ao sistema enzimático álcool desidrogenase

Rf Parcela -Árvore	0,20	0,30	0,36	0,44	0,49	0,56	0,60
4/10-A1	0	0	0	0	1	1	0
5/6A-A2	0	1	0	1	0	0	0
5/6A-A3	0	1	0	1	0	0	0
5/6A-A4	1	1	0	1	0	0	0
5/7A-A5	0	1	0	1	0	0	0
5/7A-A6	0	1	0	1	0	0	0
5/9-A7	0	1	0	1	0	0	0
5/9-A8	0	1	0	1	0	0	0
6/7-A9	0	0	0	0	1	0	0
6/7-A10	0	1	1	0	0	0	0
6/7-A11	0	1	0	1	0	0	0
6/7-A12	0	1	0	1	1	0	0
6/7-A13	0	1	1	0	0	0	0
6/7-A14	0	1	0	1	0	0	0
6/7-A15	0	1	0	0	0	0	0
6/8-A16	0	0	0	0	1	0	0
6/8-A17	0	1	0	1	0	0	0
6/8-A18	0	1	0	1	1	1	0
7/7-A19	0	1	0	0	1	0	0
7/7-A20	0	1	0	1	0	0	0
7/7-A21	1	1	0	0	0	0	0
7/7-A22	0	1	1	0	0	0	0
7/8A-A23	0	1	0	1	0	0	0
7/8A-A24	0	1	0	1	0	0	0
7/8A-A25	0	1	1	0	0	0	0
7/8A-A26	0	1	0	0	0	0	0
8/6-A27	0	1	1	0	0	0	0
8/6-A28	0	1	1	0	0	0	0
8/6-A29	0	1	1	0	0	0	0
8/6-A30	0	1	1	0	0	0	0
8/6-A31	0	1	0	1	0	0	0
8/6-A32	0	1	0	1	0	0	0
8/6-A33	0	1	1	1	0	0	0
8/7-A34	0	1	0	0	1	0	0
8/7-A35	0	0	0	0	1	1	0
8/8-A36	0	1	0	0	0	0	0
8/8-A37	0	1	0	0	0	0	0
8/11-A38	0	1	1	0	0	0	0
9/4-A39	0	1	1	1	0	0	0
9/4-A40	0	1	0	0	0	0	0
9/4-A41	0	1	0	1	0	0	0
9/4-A42	0	1	0	1	0	0	0
9/5-A43	0	1	0	0	0	0	0
9/6-A44	1	1	0	1	0	0	0
9/6-A45	0	1	0	0	1	0	0
9/6-A46	0	1	0	0	1	0	0
9/6-A47	0	1	0	0	1	0	0
9/6-A48	0	1	0	1	0	1	1
9/6-A49	0	1	0	1	0	0	0
10/5-A50	0	1	0	1	0	0	1
10/10-A51	0	1	0	0	1	0	0
10/10-A52	0	1	0	0	1	0	0
10/10-A53	0	1	0	0	1	0	0
10/10-A54	1	1	0	1	0	0	1
10/10-A55	0	1	0	1	0	0	1
10/10-A56	0	1	0	1	0	0	1
10/10-A57	1	1	0	0	1	0	0
10/10-A58	0	0	0	1	1	0	1
10/10-A59	0	1	0	0	1	0	0
12/4-A60	0	1	0	1	0	0	1
13/5-A61	0	1	0	1	0	0	1
13/5-A62	0	0	0	1	0	0	1
17/5-A63	0	1	0	0	0	0	0
Chaminé-A64	0	1	0	1	0	0	1
Chamusca- A65	0	1	0	0	0	0	0
João Galego-A66	0	0	1	1	0	0	1
V.Pocinho-A67	0	1	0	1	0	0	0
V.Pocinho-A68	0	1	0	0	0	0	1
V.Pocinho-A69	0	1	0	0	0	0	1

Quadro 6- Registo do zimograma referente ao sistema enzimático leucina aminopeptidase

Parcela - Árvore	Rf	0,07	0,31	0,40	0,46
4/10-A1		0	1	0	1
5/6A-A2		1	1	0	1
5/6A-A3		1	1	0	1
5/6A-A4		1	1	0	1
5/7A-A5		1	1	0	1
5/7A-A6		1	1	0	1
5/9-A7		1	1	0	1
5/9-A8		1	1	0	1
6/7-A9		1	1	0	1
6/7-A10		1	1	0	1
6/7-A11		1	1	0	1
6/7-A12		1	1	1	1
6/7-A13		1	1	0	1
6/7-A14		1	1	0	1
6/7-A15		1	1	0	1
6/8-A16		1	1	0	0
6/8-A17		1	1	0	1
6/8-A18		1	1	0	1
7/7-A19		1	1	1	1
7/7-A20		1	1	0	1
7/7-A21		1	1	0	1
7/7-A22		1	1	0	1
7/8A-A23		1	1	0	1
7/8A-A24		1	1	1	1
7/8A-A25		1	1	0	1
7/8A-A26		1	1	0	1
8/6-A27		1	1	0	1
8/6-A28		1	1	0	1
8/6-A29		1	1	0	1
8/6-A30		1	1	0	1
8/6-A31		1	1	0	1
8/6-A32		1	1	0	1
8/6-A33		1	1	0	1
8/7-A34		1	1	0	1
8/7-A35		1	1	0	1
8/8-A36		1	1	0	1
8/8-A37		0	0	0	1
8/11-A38		1	0	0	1
9/4-A39		1	1	0	1
9/4-A40		1	1	0	1
9/4-A41		1	1	0	1
9/4-A42		1	1	0	1
9/5-A43		1	1	0	1
9/6-A44		1	1	0	1
9/6-A45		1	1	0	1
9/6-A46		1	1	0	1
9/6-A47		1	1	0	1
9/6-A48		1	1	0	1
9/6-A49		1	1	0	1
10/5-A50		0	0	0	1
10/10-A51		1	1	0	1
10/10-A52		1	0	0	1
10/10-A53		1	1	0	1
10/10-A54		1	1	0	1
10/10-A55		0	0	0	1
10/10-A56		0	0	0	1
10/10-A57		1	1	0	1
10/10-A58		1	1	0	1
10/10-A59		1	1	0	0
12/4-A60		1	1	0	1
13/5-A61		1	0	0	1
13/5-A62		1	0	0	1
17/5-A63		1	1	0	1
Chaminé-A64		0	1	0	1
Chamusca-A65		1	1	0	1
João Galego-A66		0	0	0	1
V.Pocinho-A67		1	1	0	1
V.Pocinho-A68		1	0	0	1
V.Pocinho-A69		1	1	0	1

ANEXO VI

**Registo do conjunto de bandas analisadas nos seis sistemas enzimáticos
(Matriz de dados)**

Árvores	α,β -EST (R _f)														ACP (R _f)										GOT (R _f)						
	0,07	0,14	0,18	0,23	0,27	0,32	0,34	0,40	0,44	0,49	0,50	0,56	0,63	0,74	0,07	0,10	0,13	0,16	0,22	0,31	0,34	0,40	0,46	0,51	0,20	0,22	0,25	0,27	0,31	0,34	
A1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
A2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
A3	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
A4	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
A5	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	
A6	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
A7	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	
A8	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
A9	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
A10	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	
A11	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
A12	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	
A13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A14	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A15	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A16	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A17	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
A18	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
A19	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
A20	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
A21	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
A22	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
A23	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
A24	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
A25	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A26	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
A27	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A28	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
A29	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A30	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A31	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
A32	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A33	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A34	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
A35	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
A36	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A37	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A38	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
A39	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
A40	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
A41	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
A42	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
A43	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
A44	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A45	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A46	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
A47	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
A48	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
A49	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
A50	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A51	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A53	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A54	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
A55	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
A56	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
A57	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
A58	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
A59	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
A60	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A61	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0															

**Registo do conjunto de bandas analisadas nos seis sistemas enzimáticos
(Matriz de dados) (continuação)**

Árvores	PGI (Rf)														ADH (Rf)						LAP (Rf)						
	0,35	0,38	0,41	0,07	0,10	0,14	0,19	0,22	0,26	0,29	0,40	0,43	0,55	0,66	0,20	0,30	0,36	0,44	0,49	0,56	0,60	0,07	0,31	0,40	0,46		
A1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1		
A2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A4	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A6	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A7	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A8	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	
A10	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1		
A11	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A12	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1		
A13	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1		
A14	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A15	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1		
A16	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0		
A17	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1		
A18	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1		
A19	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1		
A20	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A21	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
A22	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1		
A23	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A24	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1		
A25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	
A26	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1		
A27	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	
A28	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	
A29	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	
A30	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	
A31	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	
A32	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
A33	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	
A34	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	
A35	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	
A36	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
A37	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
A38	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	
A39	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	
A40	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
A41	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	
A42	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	
A43	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
A44	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	
A45	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	
A46	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	
A47	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	
A48	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	
A49	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	
A50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	
A51	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	
A52	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	
A53	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	
A54	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	
A55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
A56	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	
A57	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	
A58	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1		
A59	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	
A60	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	
A61	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	
A62	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	
A63	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
A64	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	
A65	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
A66	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	
A67	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
A68	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
A69	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	

ANEXO VII

Registo do de características morfológicas da cortiça para as 59 árvores
(Matriz de dados)

Árvores	BC	BR	BLT	BLTA	BLA	BLO	BLD	BLDI	BID	MIT	MITA	MID	MCLF	MCLT	MCLD	MES	MESE
A2	5	5	12	10	5	0	15	0	0	5	0	0	0	0	10	0	13
A3	10	5	34	15	20	0	0	0	0	10	5	5	0	10	20	2	4
A4	0	5	19	20	5	0	0	0	0	0	0	0	2	15	10	0	9
A5	10	10	28	22	10	0	15	0	0	10	35	25	0	15	10	3	9
A6	0	5	13	12	10	0	15	0	0	0	0	0	0	15	0	1	12
A7	5	5	19	20	5	0	30	10	0	10	10	25	0	15	10	0	7
A8	5	5	15	15	0	0	15	10	0	20	5	5	0	20	10	0	23
A9	5	5	30	20	20	0	15	10	0	20	5	5	0	30	10	0	0
A10	0	0	23	10	10	0	15	0	0	10	5	5	0	10	10	0	18
A11	5	5	24	15	0	0	15	0	0	10	2	0	0	15	10	0	29
A12	5	5	5	20	20	0	15	0	0	15	3	5	0	10	0	0	21
A13	5	5	19	20	10	0	30	0	0	20	0	0	0	15	10	8	6
A14	0	10	13	15	10	0	15	0	0	0	0	0	0	15	10	0	13
A15	5	5	13	20	10	0	15	0	0	0	0	0	0	15	10	0	21
A16	10	5	14	10	0	0	0	0	0	10	5	5	0	15	10	8	0
A17	5	15	18	18	0	0	15	0	0	20	28	45	0	10	10	0	13
A18	10	0	12	22	5	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	2	18
A19	5	5	15	15	10	0	15	0	0	10	10	25	0	15	0	15	0
A20	10	5	15	15	0	0	0	15	0	20	20	5	0	10	10	15	20
A21	10	10	25	15	5	0	0	0	0	20	20	25	0	15	10	15	20
A22	10	10	25	20	20	0	15	0	0	10	5	5	0	15	10	15	20
A23	5	5	15	12	15	0	30	0	0	10	5	5	0	5	10	1	4
A24	5	10	19	11	20	0	30	0	0	10	5	0	0	5	10	7	3
A25	5	10	29	20	20	0	15	0	0	20	10	25	0	15	0	5	4
A26	0	5	24	15	20	0	30	0	0	10	20	45	0	20	10	3	9
A34	5	5	28	20	5	0	15	0	0	10	2	5	0	5	20	5	5
A35	5	5	15	15	20	0	15	0	0	15	0	0	5	15	10	10	7
A36	5	15	25	20	20	0	15	0	0	20	20	25	0	15	0	10	0
A37	10	15	12	25	20	0	15	0	0	20	20	25	0	15	10	0	15
A39	5	5	44	12	10	0	30	0	0	10	5	5	0	0	20	0	10
A40	5	5	13	10	20	0	15	0	0	20	5	5	0	0	20	0	10
A42	5	2	15	15	0	0	15	10	0	10	5	25	0	15	20	0	10
A43	10	5	14	15	15	0	15	0	0	0	0	0	5	0	10	3	4
A44	10	10	35	20	0	0	15	10	0	20	10	25	0	15	10	1	6
A45	10	10	35	15	5	0	15	0	0	20	30	25	0	15	10	3	3
A46	0	5	23	15	0	0	15	10	0	0	0	0	0	10	10	2	6
A47	10	5	32	25	20	0	15	0	0	10	5	5	0	20	10	3	11
A48	5	5	18	15	5	0	15	0	0	10	5	5	0	15	10	2	5
A49	5	5	28	20	10	0	0	10	0	10	5	5	0	15	10	2	3
A50	10	5	45	20	0	0	0	0	0	20	20	5	0	15	0	3	18
A51	5	5	15	12	0	0	0	0	0	20	10	5	0	5	0	0	5
A52	5	10	31	15	15	0	15	0	0	0	15	45	0	10	0	0	10
A53	5	5	31	20	20	0	15	0	0	10	5	5	0	15	0	7	3
A54	10	5	31	20	0	0	0	0	0	10	20	25	0	15	10	0	12
A55	5	5	30	25	20	0	15	0	0	10	20	25	5	15	20	1	11
A56	10	10	28	25	20	0	10	0	0	20	25	45	0	15	20	3	13
A57	5	5	21	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	20	2	9
A58	10	5	22	15	15	0	15	10	0	10	5	5	5	15	10	0	10
A59	5	10	21	25	20	0	15	0	0	10	30	45	0	15	10	2	4
A60	5	10	40	15	20	0	15	0	0	20	5	5	0	10	10	0	2
A61	5	10	13	10	10	0	15	0	0	5	0	5	0	0	10	0	3
A62	5	5	10	15	20	0	30	10	0	10	5	5	0	0	10	3	3
A63	0	0	5	10	5	0	15	10	0	10	20	45	0	20	20	0	15
A64	10	0	10	25	0	0	15	0	0	0	0	0	0	7	5	0	5
A65	5	5	15	20	5	0	15	10	7	20	20	45	0	10	20	0	10
A66	5	5	15	20	5	0	15	15	15	20	20	25	0	15	10	0	7
A67	5	15	37	20	5	5	15	0	0	10	5	5	0	5	10	0	5
A68	5	0	12	15	5	0	15	0	0	20	10	5	0	5	5	0	12
A69	5	5	11	15	5	0	15	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0

Registo do de características morfológicas da cortiça para as 59 árvores
(Matriz de dados) (continuação)

Árvores	MEM	MED	MCC	MACT	MACI	MVI	MVE	MVD	MC	CRF	CRE	CFC	ESP	DU	DA
A2	0	20	0	2	0	5	0	0	5	15	0	0	24	5,38	0,237
A3	10	35	0	15	15	10	5	10	5	15	0	0	37	4,69	0,193
A4	9	5	0	0	0	10	20	5	0	15	0	0	27	4,88	0,192
A5	11	35	0	15	10	0	0	0	5	15	0	20	18	7,38	0,293
A6	5	20	0	10	0	0	0	0	0	15	0	20	20	7,88	0,256
A7	0	35	0	10	0	10	5	0	5	15	0	0	27	11,80	0,244
A8	0	35	0	15	5	10	5	10	5	30	0	0	25	5,00	0,22
A9	50	20	0	15	5	20	5	5	5	15	0	0	45	6,10	0,233
A10	0	20	0	5	0	0	0	0	5	15	0	0	18	11,00	0,244
A11	0	35	0	10	10	10	5	0	5	15	0	0	34	7,00	0,238
A12	0	20	0	10	0	0	0	0	5	15	0	10	20	5,80	0,285
A13	0	35	0	15	5	10	5	10	5	15	0	10	35	12,00	0,213
A14	0	20	0	15	5	0	0	0	5	15	0	20	25	7,00	0,239
A15	0	20	0	15	5	10	5	0	10	15	0	0	25	5,80	0,216
A16	0	5	0	20	5	10	5	5	0	15	0	10	25	5,00	0,208
A17	0	5	0	0	0	0	0	0	5	15	0	20	20	7,50	0,369
A18	0	20	0	15	5	10	5	10	10	15	0	10	24	2,88	0,203
A19	0	0	0	35	20	20	5	35	5	15	0	20	27	6,37	0,218
A20	30	20	0	20	20	10	5	20	5	15	0	0	24	9,94	0,222
A21	45	20	0	35	20	20	5	20	0	15	0	0	26	4,31	0,206
A22	60	35	0	20	10	20	5	35	0	15	0	0	40	8,18	0,204
A23	20	5	0	15	0	0	0	0	5	15	0	20	12	11,00	0,219
A24	0	20	0	20	5	0	0	0	5	15	0	0	15	12,00	0,197
A25	14	20	0	0	0	0	0	0	5	15	0	0	22	4,00	0,296
A26	16	35	0	5	0	20	5	0	0	15	0	10	35	10,00	0,249
A34	0	5	0	15	5	20	5	10	5	15	0	10	33	8,30	0,225
A35	16	35	0	0	0	10	5	0	5	15	0	10	27	7,50	0,222
A36	10	20	0	15	10	10	5	10	5	15	35	20	28	6,56	0,277
A37	15	20	0	0	0	20	20	35	10	15	0	10	34	8,13	0,286
A39	0	5	0	10	5	0	0	0	0	15	0	0	21	11,19	0,249
A40	0	5	0	10	5	10	0	0	0	15	20	0	15	7,44	0,345
A42	0	35	5	5	0	0	0	0	10	25	0	0	22	8,00	0,278
A43	14	20	0	15	5	20	20	35	10	15	15	0	38	6,18	0,249
A44	14	20	0	10	5	10	5	0	5	15	0	10	25	7,00	0,206
A45	7	5	0	5	10	0	0	0	10	15	0	20	24	9,50	0,282
A46	5	20	0	0	0	10	5	0	0	15	0	20	25	7,00	0,198
A47	24	35	0	5	0	0	0	0	10	15	20	0	35	7,60	0,246
A48	8	20	0	10	10	10	5	0	5	0	0	20	24	6,60	0,201
A49	9	20	0	15	0	20	5	5	5	15	0	20	26	4,50	0,219
A50	6	35	0	0	0	20	20	35	10	15	0	0	23	3,44	0,243
A51	0	5	0	15	10	20	20	35	10	15	0	0	24	4,00	0,201
A52	6	5	0	10	5	20	5	10	5	10	20	20	26	7,50	0,267
A53	4	20	0	10	10	10	5	10	5	15	0	0	40	8,60	0,195
A54	3	5	0	15	10	20	25	35	10	15	0	0	26	4,00	0,215
A55	8	20	0	10	5	20	5	10	5	15	0	0	40	7,60	0,221
A56	0	5	0	5	0	5	0	0	5	10	20	20	20	8,40	0,295
A57	5	35	0	15	10	20	5	10	5	20	0	0	38	4,40	0,199
A58	0	5	5	0	0	5	0	0	5	10	0	0	24	7,80	0,245
A59	3	20	0	5	0	20	5	10	10	15	0	20	34	6,40	0,209
A60	10	20	0	5	0	20	30	5	10	15	0	10	28	8,00	0,265
A61	20	20	0	5	0	5	5	5	0	15	0	0	27	5,56	0,235
A62	20	20	0	10	5	0	0	0	0	20	0	0	28	12,60	0,268
A63	27	20	0	0	10	0	0	0	0	15	0	0	24	6,81	0,236
A64	0	35	10	0	0	10	5	0	15	25	0	10	36	6,00	0,246
A65	5	10	7	5	0	0	0	0	5	10	0	0	27	5,06	0,253
A66	0	35	2	0	10	0	0	0	15	30	0	10	16	10,00	0,349
A67	15	20	5	5	0	0	0	0	10	15	15	0	34	6,00	0,292
A68	10	5	0	0	0	0	0	0	5	10	15	10	33	7,00	0,259
A69	0	35	12	0	0	0	0	0	2	15	0	0	33	8,00	0,281