

SILVA LUSITANA

REVISTA DA ESTAÇÃO FLORESTAL NACIONAL

SEPARATA

VOL 5, nº 1, Junho 1997

O Polimorfismo Isoenzimático na Caracterização do Sobreiro^(*)

Filomena Nóbrega

Assistente de Investigação

Estação Florestal Nacional, Tapada das Necessidades, 1350 Lisboa

Sumário. O presente trabalho pretende 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.

Realizaram-se análises isoenzimáticas por electroforese horizontal em gel de poliacrilamida, em 69 árvores previamente seleccionadas, nos 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.

Palavras-chave: sobreiro; *Quercus suber* L.; isoenzimas, índices de polimorfismo; taxonomia numérica

Abstract. 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.

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 have analysed the results with the use of numerical taxonomy methods.

Key words: cork oak; *Quercus suber* L.; isoenzymes, polymorphic indices; numerical taxonomy

Résumé. Ce travail a pour objectif le progrès de la connaissance sur la variabilité génétique du chêne liège (*Quercus suber* L.) et la recherche des relations possibles entre les modèles de la variabilité génétique et de la variabilité phénotypique de la qualité du liège, grâce à l'étude du

(*) Este trabalho constituiu a 1ª parte do tema da Tese de Doutoramento da autora.

polymorphisme isoenzymatique.

Des analyses isoenzymatiques, par la méthode de l'électrophorèse horizontale en gel de polyacrilamide, ont été réalisées sur 69 arbres préalablement choisis, révélant les six systèmes enzymatiques suivants: α, β -carboxylestérase (EC.3.1.1.1), phosphatase acide (EC.3.1.3.2), aspartate aminotransferase (EC.2.6.1.1), phosphoglucose isomérase (EC.5.3.1.9) alcool déshydrogénase (EC.1.1.1.1) et leucinae aminopeptidase (EC.3.4.11.1).

Considérant les résultats obtenus, on a estimé la variabilité génétique intra populationnelle, déterminée par les indices de polymorphisme, et on a analysé les résultats en utilisant des méthodes de taxonomie numérique.

Mots clés: chêne liège; *Quercus suber* L.; isoenzymes; indices de polymorphisme; taxonomie numérique

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, 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.

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 heterogêneas 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).

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).

As avaliações quantificadas da qualidade da cortiça têm mostrado uma grande diversidade, mais significativa dentro das estações ecológicas do que entre estações, o que corrobora a afirmação que a qualidade da cortiça, medida fundamentalmente pelo arranjo lenticular e pela sua natureza, é fundamentalmente de natureza genética, e que a influência do meio não explica as diferenças encontradas.

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

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, conhecimentos particularmente valiosos e com capacidade de elevado valor acrescentado 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.

Na década de 60, a identificação e caracterização de diferentes indivíduos de uma espécie através do estudo de populações segregantes, utilizava marcadores que eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual. Estes marcadores contribuíram para o desenvolvimento teórico da análise gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos, mas o reduzido número de marcadores morfológicos distintos, somente identificados, na sua maioria, ao nível da planta inteira ou adulta, restringia a cobertura do genoma e a possibilidade de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e caracteres de importância económica.

O desenvolvimento de marcadores bioquímicos originou uma maior disponibilidade de informações genéticas. Os marcadores isoenzimáticos, são codominantes contendo maior informação genética por locus, e, em geral, com mínimo ou nulo efeito epistático ou pleiotrópico, e neutros em relação a efeitos fenotípicos, têm um nível de polimorfismo alto para cada locus estudado, e permitem caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de amostras de tecidos ou células.

A partir de 1970 os polimorfismos isoenzimáticos começaram a ser utilizados em estudos genéticos em espécies florestais e, ainda hoje, a caracterização bioquímica continua a ter um papel importante no melhoramento florestal pela informação genética que fornece e pela objectividade que confere ao estabelecimento de diferenças entre indivíduos e populações.

Na tentativa de contribuir para o aumento de conhecimento da estrutura genética como instrumento de apoio para o programa de melhoramento da espécie, realizou-se este trabalho com os seguintes objectivos:

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

Isoenzimas

As isoenzimas definem um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma

enzima que ocorre numa espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas.

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).

Embora as isoenzimas desempenhem a mesma actividade catalítica, podem ter propriedades cinéticas diferentes e ser separadas electroforeticamente, o que significa que as isoenzimas de um mesmo grupo diferem na sequência de aminoácidos que constituem as suas cadeias polipeptídicas, o que, por sua vez, influenciará a natureza das estruturas proteicas secundária, terciária e quaternária da enzima.

Como a sequência nucleotídica de um gene é colinear com a sequência de aminoácidos, as diferenças na mobilidade das isoenzimas sob a acção de um campo eléctrico são resultantes de diferenças ao nível de sequências de DNA que codificam aquelas enzimas. Assim, para perfis electroforéticos diferentes, pode-se assumir que essas diferenças possuem uma base genética, isto é, as isoenzimas permitem detectar diferenças genéticas tão próximo quanto possível do nível do DNA, permitindo também estimar determinados parâmetros, como frequências genotípicas e frequências alélicas, e a partir destas a variação genética em populações e espécies. (ADAMS, 1983; BAILEY, 1983; PEIRCE e BREWBAKER, 1973).

Apesar das vantagens referidas das isoenzimas, que ainda hoje continuam a ser uma classe de marcadores com grande utilidade para análises genéticas, existem duas limitações fundamentais que restringem a sua aplicabilidade: o número total de loci que podem ser detectados no genoma e o número de alelos por locus, ou seja, o nível de polimorfismo genético que se consegue detectar em cada locus.

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 e outras 20-30% de substituições resultam em alterações conformacionais apenas detectáveis por técnicas mais sensíveis, e, portanto, este nível de observação não permite um conhecimento completo do genoma, o que dificulta a possibilidade de relacionar isoenzimas e genes que controlam características de interesse. Além disso, o nível de polimorfismo detectável é limitado, uma vez que as enzimas possuem função metabólica (BERGMANN, 1991; LEWONTIN, 1973).

Outras limitações das isoenzimas a ter em conta são as diferenças na actividade isoenzimática associada a diferentes estádios de desenvolvimento, a especificidade em alguns tecidos vegetais e a dificuldade na interpretação dos zimogramas quando isoenzimas com mobilidades electroforéticas idênticas representam loci distintos (WENDEL e WEEDEN, 1989).

A detecção das isoenzimas envolve fundamentalmente três etapas: a preparação dos extractos da amostra, a separação electroforética e a revelação do gel para visualização das respectivas bandas.

O estudo isoenzimático pode ser realizado em extractos de uma grande variedade de tecidos vegetais, como 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, assegurando sempre as mesmas condições fisiológicas e ontogenéticas para as diferentes amostras.

O tecido escolhido para análise electroforética é macerado na presença de uma solução tampão com os inibidores adequados, para que ocorra a extracção das enzimas sem perda de actividade enzimática e com completa complexação dos compostos fenólicos e remoção de outros interferentes (FERET e BERGMANN, 1976).

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

- Formação de ligações reversíveis entre os grupos hidroxilo dos fenóis e o grupo carboxilo das proteínas originando compostos insolúveis;
- 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 fenoxidase e peroxidase, que estão presentes nos tecidos vegetais;
- Formação de ligações iónicas entre o ião fenolato e os centros activos catiónicos das enzimas, provocando a desnaturação das proteínas.

Após a extracção, recorre-se à electroforese em gel para a separação das isoenzimas. São vários os tipos de gel e as soluções tampão que podem ser utilizadas nesta etapa, passando o sucesso desta análise pela aferição e optimização das condições a adoptar de acordo com a espécie e o tipo de tecido em estudo.

Terminada a electroforese, as isoenzimas são detectadas *in situ* através de reacções de coloração com corantes histoquímicos específicos que fornecem um substrato para as enzimas. O perfil de bandas isoenzimáticas resultante (zimograma) permite-nos visualizar as bandas electroforéticas, que são 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 (GABRIEL e GERSTEN, 1992; PASTEUR *et al.*, 1988).

Em espécies florestais, são já numerosos os trabalhos publicados sobre estudos de polimorfismos isoenzimáticos. 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.

Variabilidade genética intravarietal de populações de espécies florestais

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 diversos autores, entre os quais os de HAMRICK *et al.* (1979) em 110 espécies vegetais, e o de LUMARET *et al.* (1991) em *Quercus ilex*, mostram que as espécies alogâmicas possuem uma grande variação genética intravarietal.

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).

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.

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 (índice de polimorfismo)

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.

Material e métodos

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 lenticulas 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 lenticulas 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, em que 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 Ecossistema 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 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 sobre nas províncias do Alentejo e Ribatejo.

A amostra sobre a qual incidiu o estudo incluiu 69 árvores 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 1, e o material optado como fonte enzimática foi o pólen.

Para a extracção das enzimas macerou-se o pólen numa solução tampão Tris/HCl 0.150M, pH 7.5, com 5% de sacarose e 0,1% de 2-mercaptoetanol, e todas as operações de preparação decorreram a 4°C (NÓBREGA, 1990, 1992; NÓBREGA *et al.*, 1990).

Para a separação electroforética utilizou-se um sistema horizontal em gel de poliacrilamida com uma concentração de acrilamida de 7.5%, e para a migração electroforética um tampão tris/glicina a pH 8,3, e as isoenzimas estudadas foram: a,b-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) (BRUNO DE SOUSA, 1983; CABRAL, 1990).

Estimativa do polimorfismo intrapopulacional

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^{a} , $q_i = (1 - p_i)$, 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).

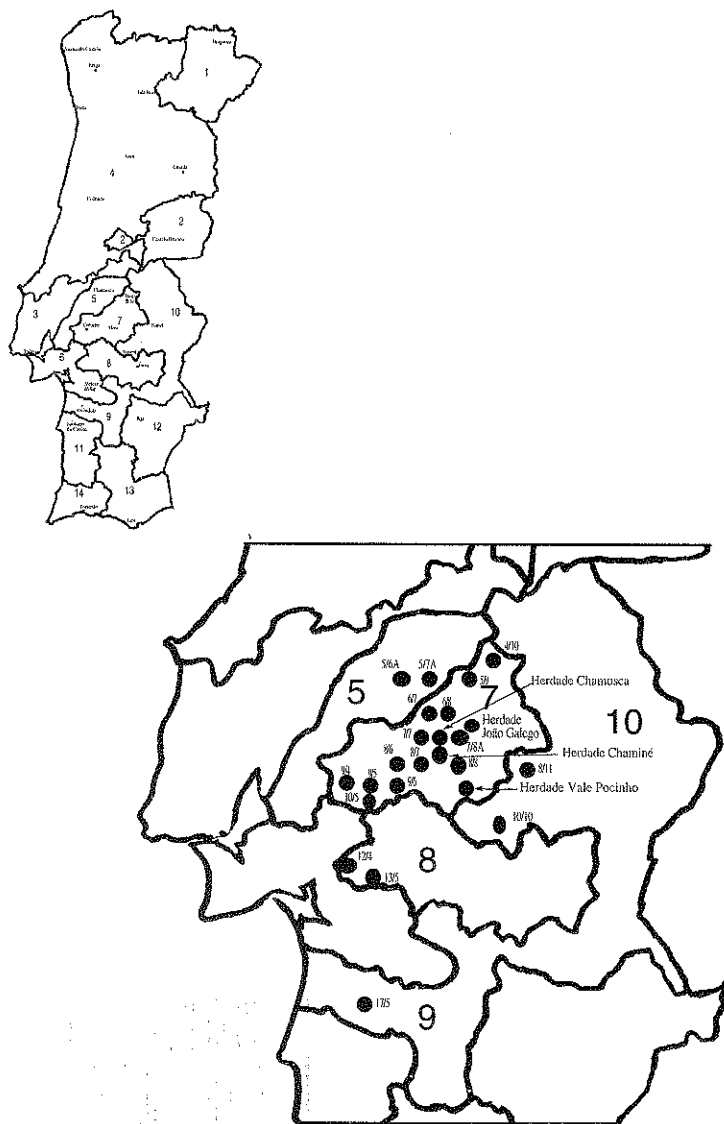


Figura 1 - Mapa da localização das parcelas analisadas e das zonas de produção de cortiça

Métodos de taxonomia numérica

A fim de comparar e classificar objectivamente estas árvores e agrupá-las de acordo com as suas semelhanças, a análise dos resultados electroforéticos dos 6 sistemas enzimáticos (dados qualitativos) foi feita recorrendo a métodos de taxonomia numérica, e a figura 2 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).

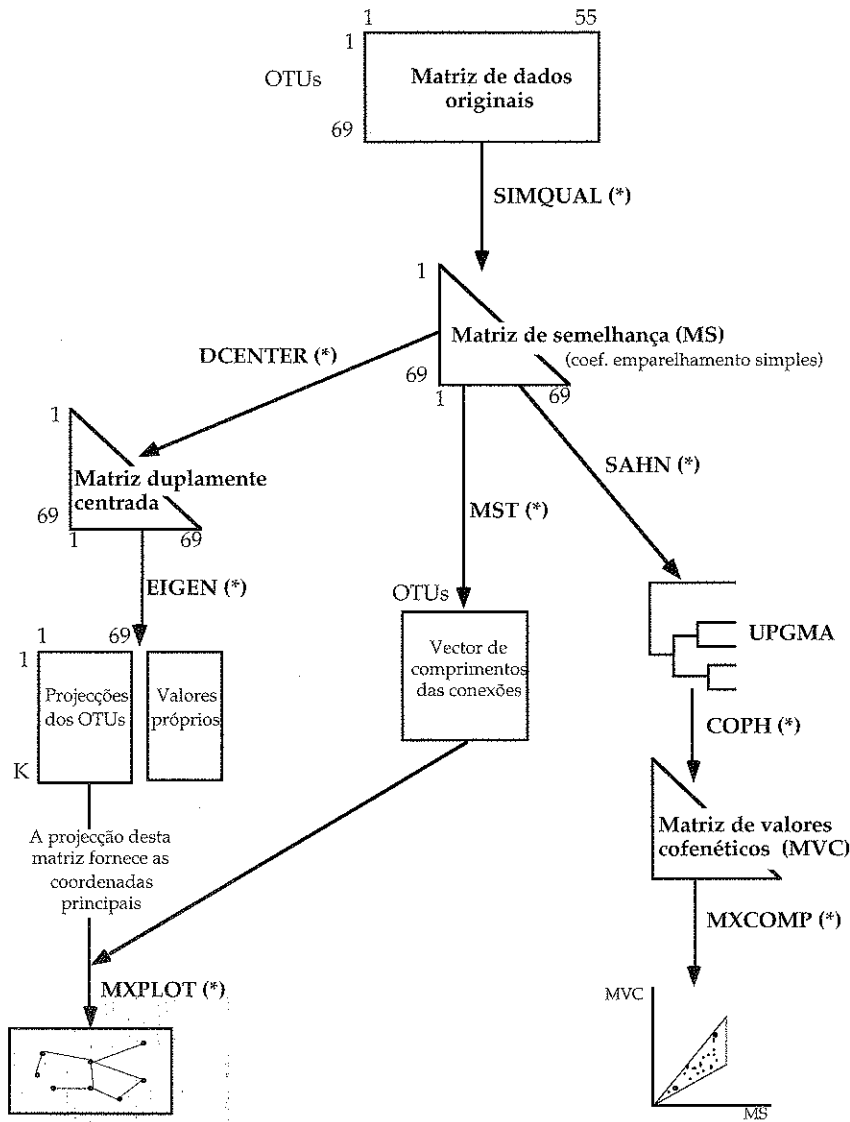


Figura 2 - Fluxograma para dados qualitativos. (*) Programas que operam sobre as matrizes usadas no sistema de programas NTSYS (VER. 1.7)

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.

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, e 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).

Para o fenograma assim obtido, e para verificar se era uma representação aceitável dos dados originais, calculou-se o coeficiente de correlação co-fenética.

Usou-se ainda outro método de agregação, a árvore de conexão mínima (MST - Minimum Spanning Tree), resultando uma "rede" de ligação entre as diferentes árvores.

Para a representação gráfica das árvores ao longo de eixos, seleccionou-se o método de ordenação em coordenadas principais.

A sobreposição da árvore de conexão mínima às projecções das árvores obtidas pela análise em coordenadas principais permite-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.

Resultados e Discussão

Estimativa do polimorfismo intrapopulacional

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

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%). 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), registados no quadro 1, e com a variação representada na figura 3.

Quadro 1 - Índices de polimorfismo

| Sistema enzimático | Índices de polimorfismo |
|--|-------------------------|
| Carboxilesterase (EC.3.1.1.1) | 0,154 |
| Fosfatase ácida (EC.3.1.3.2) | 0,120 |
| Aspartato aminotransferase (EC.2.6.1.1.) | 0,165 |
| Fosfogluose isomerase (EC.5.3.1.9) | 0,175 |
| Álcool desidrogenase (EC.1.1.1.1) | 0,136 |
| Leucina aminopeptidase (EC.3.4.11.1) | 0,068 |
| Média ponderada | 0,145 |

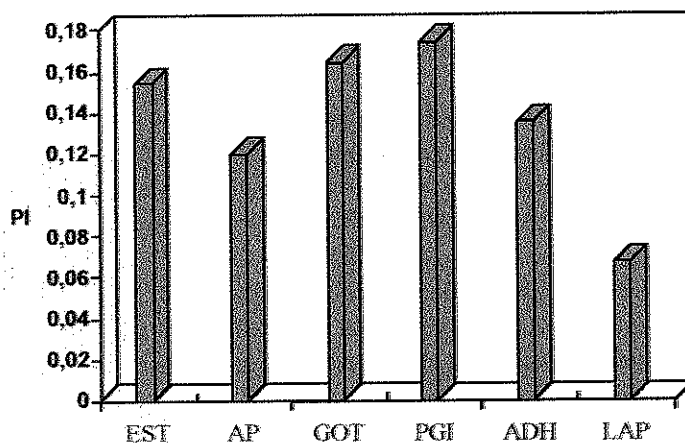


Figura 3 - Variação dos índices de polimorfismo para cada sistema enzimático

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.

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 1 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 2.

As subpopulações das zonas 8 e 9 têm um número de árvores inferior a 5, pelo que não foram consideradas. Para as restantes zonas, e ainda que o número de árvores em cada zona seja diferente e reduzido nas zonas 5 e 10, 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.

Quadro 2 - 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 |

Na figura 4 está representada a variação dos índices de polimorfismo para cada subpopulação e para cada sistema enzimático.

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.

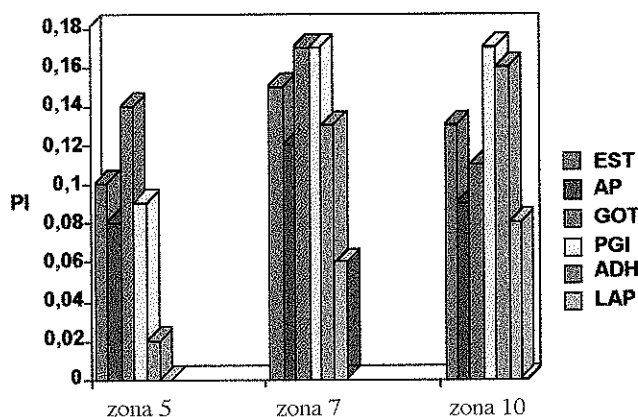


Figura 4 - Variação dos índices de polimorfismo para cada subpopulação

Análise dos dados electroforéticos por métodos de taxonomia numérica

Para 10 árvores das 69 inicialmente seleccionadas para este estudo e analisadas com base nos sistemas isoenzimáticos, existe uma grande percentagem de valores omissos para as características morfológicas da cortiça, parâmetros necessários para a concretização do segundo objectivo proposto, pelo que apresentaremos apenas a análise de resultados para as 59 árvores.

No anexo II apresenta-se o registo conjunto, para as 69 árvores, 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). A partir daquele registo, elaborou-se a matriz de dados com 59 linhas (as árvores), eliminando-se as árvores A1, A27, A28, A29, A30, A31, A32, A33, A38 e A41, e 55 colunas (as bandas isoenzimáticas).

A figura 5 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.

Da sua análise verificamos que as 59 árvores estudadas podem ser separadas em três agrupamentos, sendo o agrupamento 1 constituído pelas árvores 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 A20, A23, A24, A26, A39, A40, A42, A43, A48, A49, A60 e A66, e o 2b pelas árvores A12, A13, A19, A22, A25, A36, A37, A50, A52, A54, A55, A56, A58, A61, A62, A63, A64, A65, A67, A68 e A69.

O agrupamento 3 engloba apenas as árvores A5 e A10, das parcelas 5/7A e 6/7 respectivamente, a primeira localizada na zona 5 e a segunda na zona 7.

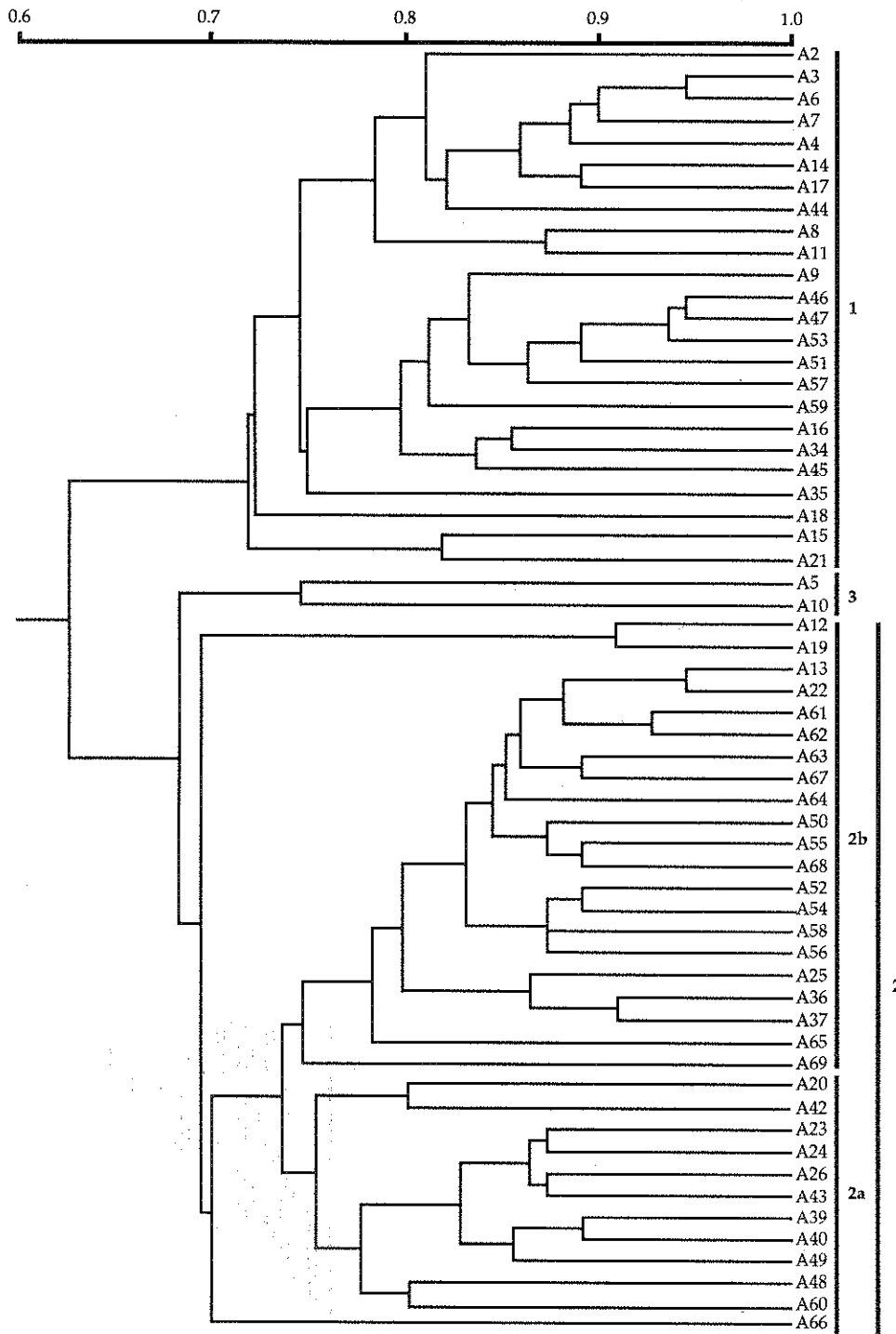


Figura 5 - Fenograma das 59 árvores baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,815$)

No quadro 3 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.

Quadro 3 - 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 | | A23 | 7/8A | | A19 | 7/7 | | |
| A4 | 5/6A | | A24 | 7/8A | | A22 | 7/7 | | |
| A6 | 5/7A | 7 | A26 | 7/8A | 7 | A25 | 7/8A | 10 | |
| A7 | 5/9 | | A39 | 9/4 | | A36 | 8/8 | | |
| 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 | | |
| A14 | 6/7 | | A48 | 9/6 | | A54 | 10/10 | | |
| A15 | 6/7 | | A49 | 9/6 | | A55 | 10/10 | | |
| A16 | 6/8 | | A60 | 12/4 | | 8 | A56 | | 10/10 |
| A17 | 6/8 | | A66 | João Galego | | 7 | A58 | | 10/10 |
| A18 | 6/8 | | | | | | A61 | | 13/5 |
| A21 | 7/7 | 7 | | | A62 | 13/5 | 7 | | |
| A34 | 8/7 | | A63 | 17/5 | 9 | | | | |
| A35 | 8/7 | | A64 | Chaminé | 7 | | | | |
| A44 | 9/6 | | A65 | Chamusco | | | | | |
| A45 | 9/6 | | A67 | V. Pocinho | | | | | |
| A46 | 9/6 | | | A68 | V. Pocinho | | | | |
| A47 | 9/6 | | | A69 | V. Pocinho | | | | |
| 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.

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 parece confirmar a independência das izoenzimas em relação ao ambiente, e, por outro lado, as árvores da mesma parcela distribuem-se por agrupamentos distintos, o que parece mostrar a grande variabilidade genética dessas mesmas árvores.

Na figura 6 apresentam-se 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 relativamente pobre da informação original.

Ao sobrepôr-se a árvore de conexão mínima, esta permitiu-nos também detectar três agrupamentos de árvores, consistentes com os agrupamentos 1, 2a e 2b detectados no fenograma, e com as árvores A5 e A10 agora englobadas no agrupamento 2a.

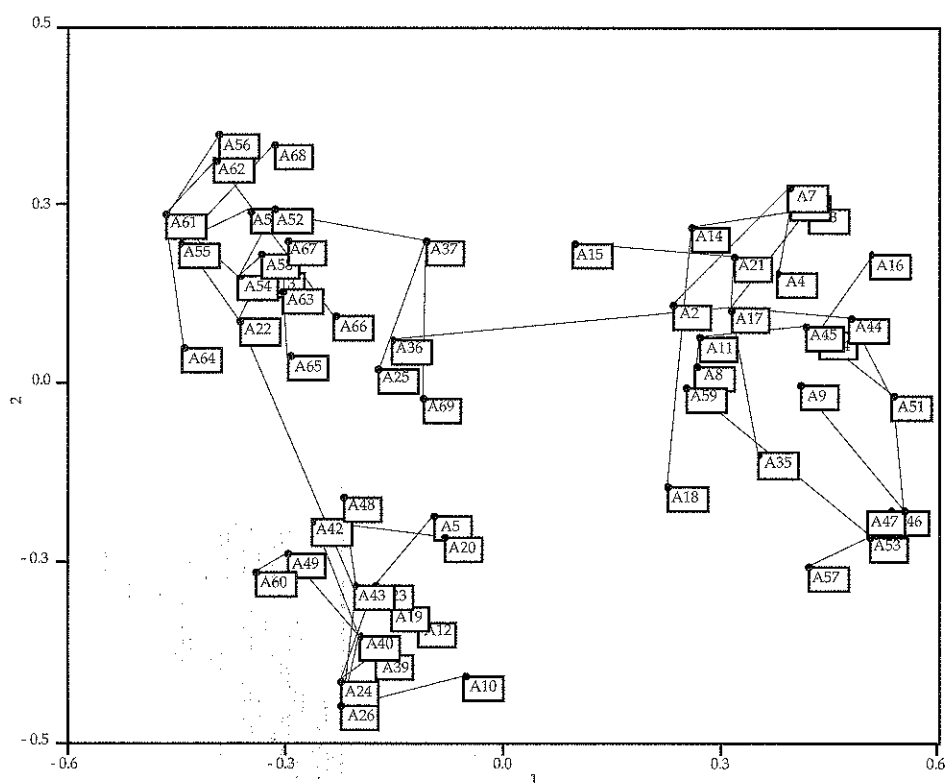


Figura 6 - Projecção das 59 árvores no plano definido pela primeira coordenada principal (18,30%) e pela segunda coordenada principal (8,00%) com base nos seis sistemas enzimáticos, à qual se sobrepôs a árvore de conexão mínima

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, e na tentativa de conhecermos quais as bandas dos perfis electroforéticos responsáveis por aqueles três agrupamentos, apresentamos na figura 7 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 variabilidade devem relacionar-se com a estrutura populacional, que considerada como a totalidade das relações ecológicas e genéticas entre os indivíduos pode variar ao longo da distribuição geográfica das populações, através do movimento dos genes via dispersão do pólen entre as populações ou subdivisões da população.

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.

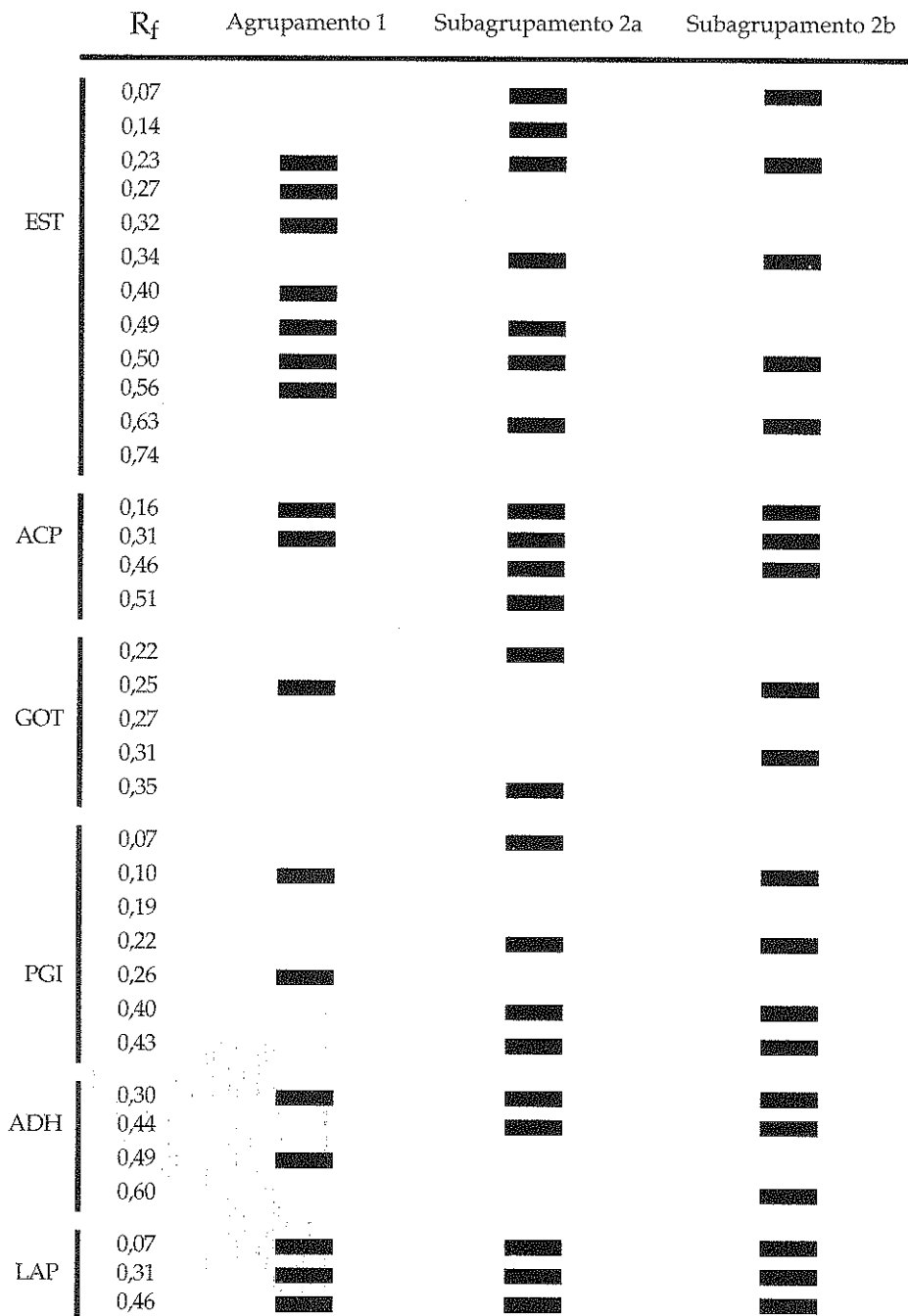


Figura 7 - Diagramas electroforéticos "teóricos" para os três agrupamentos com base nos perfis izeozimáticos das árvores constituintes de cada agrupamento e considerando-se uma frequência de 50% de presença das bandas

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).

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.

Agradecimentos

Quero deixar aqui o meu agradecimento à colaboração e dedicação do Prof. Raúl Sardinha, Prof. Raúl Bruno de Sousa e Doutor Luis Carneiro, que possibilitaram a realização deste trabalho e que muito contribuíram para a sua qualidade final.

Também aos vários técnicos da Estação Florestal Nacional, pelo apoio no trabalho de campo, execução experimental e arranjo gráfico do trabalho.

Bibliografia

- 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, pp. 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.
- 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, pp. 425-440.
- 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, pp. 67-77.
- 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, pp. 219-239.
- BRUNO DE SOUSA, R., 1983. Características das proteínas de reserva da tremocilha (*Lupinus luteus* L.). *Tese de Doutoramento*. ISA, Univ. Técn. Lisboa.
- 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".
- 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 by The Hague, The Netherlands, pp. 61-76.
- ELLSTRAND, N.C., 1992. Gene Flow Among Seed Plant Populations. *New Forests* 6 : 241-256.

- 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, pp. 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.
- 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, pp. 79-96.
- 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.
- 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.
- INVENTÁRIO FLORESTAL NACIONAL - Portugal, 1988. Divisão de Estudos Económicos. Instituto de Produtos Florestais, Lisboa.
- LEWONTIN, R.C., 1973. Population Genetics. *Annual Review of Genetics* 7: 1-17.
- LOOMIS, W.D., BATAILE, 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. Hattermer (eds): *Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands, pp. 149-153.
- 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.
- 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.
- NATIVIDADE, J. V., 1950. *Subericultura*. Lisboa
- NEL, 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 Sobreiro 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.
- 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.
- SERVIÇO TÉCNICO, 1975. Evolução dos Preços no Mato das Cortiças Amadias (1971 a 1974). *Boletim do Instituto dos Produtos Florestais - Cortiça* 436: 24-26.
- SHAW, C.R., 1969. Isozymes: Classification, Frequency, and Significance. *International Review of Cytology* 25: 297-331.
- SINGH, R.S., JAIN, S.K., QUALSET, C.O., 1973. Protein Electrophoresis as an Aid to Oat Variety Identification. *Euphytica* 22: 98-105.
- SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R., 1973. (Cit. Carneiro, 1987).
- SOKAL, R.R., MICHENER, C.D., 1958. (Cit. Carneiro, 1987).
- 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, pp. 175-205.
- 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, pp. 5-45.

(Aceite para publicação em Abril de 1997)

Anexo I

Quadro 1 - Registo do zimograma referente ao sistema enzimático das α, β -carboxilesterases

| R _r | 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 |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Parcela-Árvore | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | 0 | 1 | 0 | 1 | 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 | 1 | 0 | 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 | 1 | 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 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 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 | 0 | 0 | 0 |
| 6/8-A16 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 6/8-A17 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 6/8-A18 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 7/7-A19 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 7/7-A20 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 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 | 1 | 0 | 1 | 0 | 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 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 9/6-A44 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 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 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 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 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 10/5-A50 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 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 | 0 | 1 | 0 | 1 | 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 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 10/10-A56 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 10/10-A57 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 10/10-A58 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 10/10-A59 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 12/4-A60 | 1 | 1 | 0 | 0 | 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 |
| Chamusco-A65 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| João Galego-A66 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| V.Pocinho-A67 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 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

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

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

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

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

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

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

| R _f | 0.20 | 0.30 | 0.36 | 0.44 | 0.49 | 0.56 | 0.60 |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Parcela -Árvore | | | | | | | |
| 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 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 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 | 1 | 0 |
| 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 |
| Chamusco-A64 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Chamusco-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 | R _f | 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 | 1 | 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 | 1 | |
| 12/4-A60 | 1 | 1 | 0 | 0 | |
| 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 | |
| Chamusco-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 II

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

| Arvores | $\alpha_1\beta$ -EST (R _E) | | | | | | | | | | | | | | ACP (R _E) | | | | | | | | | | GOT (R _E) | | | | | | | | | | | |
|---------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------------|------|------|------|------|------|---|---|---|---|---|---|
| | 0,07 | 0,14 | 0,19 | 0,23 | 0,27 | 0,32 | 0,34 | 0,46 | 0,44 | 0,49 | 0,58 | 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 | 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 | 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 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| A4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| A5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 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 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | | | |
| A7 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 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 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| A9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| A10 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | |
| 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 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| A12 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| A13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 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 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| A15 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| A16 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| A17 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 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 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A19 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A20 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 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 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A22 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A23 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 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 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A25 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A26 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A27 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A28 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| A29 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A30 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A31 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A32 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A33 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 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 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A35 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A36 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A37 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 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 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A39 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A40 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A41 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A42 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A43 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A44 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A45 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A46 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A47 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 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 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A48 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A49 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A50 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A51 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A53 | 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 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A54 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

