



INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO
Universidade Técnica de Lisboa



**Caracterização de regiões genómicas
codificantes da fenilalanina amónia liase
e proteínas dirigentes em *Quercus suber***

JOÃO ALEXANDRE DIAS DA FONSECA GONÇALVES FORTES

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Biológica

JÚRI

Presidente: Doutor Arsénio Fialho, Prof. Associado, Instituto Superior Técnico

Orientador: Doutora Leonilde Moreira, Prof.^a Auxiliar, Instituto Superior Técnico

Co-orientador: Doutora Filomena Nóbrega, Investigadora Auxiliar, Estação Florestal Nacional

Vogal: Doutor Miguel Pestana, Investigador Auxiliar, Estação Florestal Nacional

Lisboa, Maio de 2007

Agradecimentos

À Doutora Filomena Nóbrega, por ter aceite ser a minha orientadora da Estação Florestal Nacional, mas principalmente empenhamento e carinho com que me acompanhou no decorrer deste trabalho científico. Expresso-lhe a minha gratidão por todos os ensinamentos que me transmitiu ao longo desta enriquecedora experiência laboratorial e por ter acreditado no sucesso desta investigação. À Doutora Filomena Nóbrega, um sincero e sentido Obrigado por todo o esforço e empenho com que acompanhou a minha Tese de Mestrado.

Ao Doutor Miguel Pestana, da Estação Florestal Nacional, pelo acompanhamento, dedicação e sobretudo pelos ensinamentos dados na área das características físicas da cortiça.

À Professora Leonilde Moreira, minha orientadora do Instituto Superior Técnico, pela aceitação e apoio prestados ao longo do período da Tese de Mestrado.

Ao Professor Rui Vidal, da Faculdade de Farmácia de Lisboa, pelo acompanhamento, sugestões e esclarecimentos no decorrer de todo o trabalho experimental e também pelo apoio prestado durante o estágio.

Aos colega de laboratório, pelos agradáveis momentos de descompressão.

À Dona Isabel, Técnica de Laboratório, pelo auxílio prestado e também pelas agradáveis conversas “nas esperas dos PCR’s”.

À Direcção da Estação Florestal Nacional, que me permitiu a realização da Tese de Mestrado.

A todos os funcionários da Estação Florestal Nacional pela amabilidade com que me receberam, trataram e integraram no seio desta instituição.

À Hélène de Oliveira, minha namorada, por todo o apoio prestado, incentivo e auxílio nos momentos “menos alegres” durante estes atarefados meses de intensivo trabalho.

À minha família, aos meus Avós e em especial à minha Mãe, Cidália Fonseca pelo apoio incondicional, auxílio e disponibilidade, não só ao longo deste trabalho, mas principalmente, pela maravilhosa e incansável Mãe que tem sido ao longo de toda a minha vida. Muito Obrigado.

E ainda, um obrigado aos meus amigos pelo apoio e amizade prestados, não só no decorrer deste trabalho, mas sim, todos os dias.

A todos, um Grande Obrigado.

Resumo

Com este trabalho, pretende-se adquirir conhecimentos fundamentais sobre a compreensão dos possíveis mecanismos genéticos associados no polimorfismo que o sobreiro apresenta, os quais se têm traduzido numa excessiva flutuação das características do tecido suberoso que se reflecte em degradação da qualidade da cortiça. Estudou-se a variabilidade genética através da caracterização de polimorfismos genómicos das regiões codificantes da fenilalanina amónia liase e de proteínas dirigentes e caracterizou-se morfologicamente a cortiça, a fim de estabelecer correlações entre sobreiros produtores de boa e má cortiça e a análise molecular.

Os resultados obtidos foram analisados recorrendo a métodos de taxonomia numérica e à sequenciação.

Demonstrou-se a grande variabilidade genética existente entre árvores e entre zonas de sobreiro, o polimorfismo nucleotídico que ocorre nas regiões codificantes das proteínas dirigentes e a diferença nos perfis de hidrofobicidade que pode justificar, nem que seja parcialmente, as diferenças (pelo menos qualitativas) entre as cortiças de boa e má qualidade.

Estudaram-se as possíveis correlações entre a análise molecular e as características físicas da cortiça.

Verificou-se que, quer na análise molecular quer na análise das características físicas da cortiça, os sobreiros não se agrupam de acordo com a localização geográfica. Verificou-se também que as regiões genómicas analisadas não estão geneticamente correlacionadas com a qualidade da cortiça.

Palavras-chave: Sobreiro, variabilidade genética, fenilalanina amónia liase, proteínas dirigentes, cortiça.

Abstract

With this thesis, the author presents the acquired knowledge, fundamental to the understanding of the possible genetic mechanisms associated in the polymorphism that cork oak possesses, which manifests through excessive fluctuation of the cork oak tissue characteristics. The genetic variability was studied through the characterisation of the genomic polymorphisms of the coding regions of phenylalanine ammonia-lyase and dirigent proteins, and the cork was morphologically characterized, in order to establish correlations between the cork oak producers of good and bad cork quality with molecular analysis.

The obtained results were analysed according to taxonomy tests and sequencing.

It was demonstrated the high level of populations genetic variability existing among trees, as well as among cork oak trees, the nucleotidic polymorphism that occurs in the coding regions of the dirigent proteins and the difference between the hydrophobicity profiles that can identify, at least qualitatively, the differences between good and bad quality.

Also, the possible correlations between the molecular analysis with the cork's physical characteristics were studied.

It was determined that, whether through molecular analysis or through the analysis of the physical characteristics of the cork, the cork oak trees are not grouped according to their location. It was also determined that the analysed genomic regions aren't genetically correlated with the cork's quality.

Keywords: *Quercus suber*, genetic variability, phenylalanine ammonia-lyase, dirigent proteins, cork

Índice Temático

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Résumé	IV
Índice	V
Índice de Tabelas	VIII
Índice de Figuras	X
Siglário	XV
1. Introdução	1
1.1. Caracterização do Sobreiro	1
1.2. Distribuição do Sobreiro	3
1.3. Importância Económica	4
1.4. A cortiça	6
Calibre	7
Densidade	8
Ensaio da Força e do Ângulo de Torção	9
Porosidade	10
1.5. Biossíntese da Suberina e da Lenhina	10
1.5.1. A Suberina	11
1.5.2. A Lenhina	13
1.6. Enzimas envolvidas na síntese da suberina e da lenhina e proteínas dirigentes	14
1.6.1. Fenilalanina amónia-liase (PAL)	14
1.6.2. Proteínas Dirigentes	15
Objectivos	16
2. Material e Métodos	17
2.1. Áreas de Estudo	17
2.2. Material Vegetal	19
2.3. A Cortiça	20
2.4. Métodos	20
2.4.1. Extracção de DNA genómico	20
2.4.2. Determinação da concentração e pureza do DNA	20
2.4.3. Amplificação do DNA por PCR	21

2.4.4. Electroforese de DNA em gel de agarose (AGE)	21
2.4.5. Variabilidade genética – Detecção de regiões codificantes de genes PAL	22
2.4.5.1. Análise dos perfis electroforéticos	23
2.4.6. Detecção de regiões codificantes de proteínas dirigentes.....	26
2.4.7. Sequenciação	27
2.4.7.1. Purificação dos produtos PCR	27
2.4.8. Amplificação das extremidades 5' e 3' das sequências das proteínas dirigentes	27
2.4.9. Polimorfismo de conformação de cadeia simples - SSCP	28
2.4.9.1. Análise SSCP	28
2.5. Análise das características físicas da cortiça	29
2.5.1. Calibre	29
2.5.2. Humidade	30
2.5.3. Porosidade.....	30
2.5.4. Densidade.....	31
2.5.5. Ensaio de Torção	31
2.5.6. Análise dos dados das características físicas da cortiça	31
3. Apresentação e Discussão dos Resultados	34
3.1. Quantificação do DNA total.....	34
3.2. Variabilidade Genética.....	35
3.2.1. Amplificação de regiões genómicas codificantes da PAL por PCR	35
Herdade do Monte Fava	37
Herdade da Palma	38
Companhia das Lezírias	39
Herdade da Espirra.....	40
3.3. Sequenciação dos produtos PCR	41
3.4. Regiões codificantes das proteínas dirigentes	42
3.4.1. Sequenciação dos produtos PCR	43
3.4.2. Estudo da hidrofobicidade das proteínas dirigentes	45
3.4.2.1. Estudo das hidrofobicidades das proteínas dirigentes dos sobreiros B7/5 e B9/21	46
3.4.3. Análise do polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP)	48
3.5. Descrição das características físicas da cortiça.....	49
Calibre	49
Densidade	50
Ensaio de Torção.....	50
Porosidade	50

Humidade	51
3.5.1. Herdade Monte Fava	51
3.5.2. Herdade de Palma	55
3.5.3. Companhia das Lezírias	57
3.5.4. Herdade da Espirra.....	60
3.6. Análise das características físicas da cortiça por métodos de taxonomia numérica	65
3.7. Estabelecimento de possíveis correlações entre a análise molecular e as características físicas da cortiça	70
4. Considerações Finais e Perspectivas.....	71
5. Bibliografia	74
Anexo A. Figuras da Introdução.....	84
Anexo B. Determinação da características físicas da cortiça.....	88
Anexo C. Análise das características físicas da cortiça por métodos de taxonomia numérica.....	91
Anexo D. Matrizes.....	105
Anexo E. Protocolos	109
Anexo F. Marcadores Moleculares	118
Anexo G. Equipamentos de Laboratório	119

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Evolução das exportações portuguesas de cortiça entre 1990 e 1998	5
Tabela 2.1 – Identificação das parcelas e dos sobreiros	19
Tabela 2.2 – Designações e sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados - PAL ..	22
Tabela 2.3 – Componentes e respectivos volumes na mistura reaccional para o conjunto de <i>primers</i> PAL	23
Tabela 2.4 – Programa de PCR utilizado para amplificação do DNA	23
Tabela 2.5 – Componentes e respectivos volumes na mistura reaccional para o Conjunto de <i>primers</i> das proteínas dirigentes	26
Tabela 2.6 – Programa de PCR utilizado para amplificação com os <i>primers</i> PS6F e PS2R.....	26
Tabela 2.7 – Designação e sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação das extremidades 5' e 3' das sequências das proteínas dirigentes	27
Tabela 2.8 – Composição do gel MDE.....	28
Tabela 2.9 – Composição da solução de aplicação de SSCP	28
Tabela 2.10 – Protocolo de coloração do gel SSCP.....	29
Tabela 3.1 – Índices de diversidade de Simpson (D') e Shannon (J') para a totalidade dos 73 sobreiros e particularizados para cada herdade	41
Tabela 3.2 – Características físicas da cortiça	49
Tabela 3.3 – Classes de calibre das pranchas de cortiça e seus principais produtos..	49
Tabela 3.4 – Diferenciação da porosidade das pranchas de cortiça e sua respectiva qualidade	50
Tabela 3.5 – Valores de calibre agrupados de modo decrescente segundo as suas designações.....	51
Tabela 3.6 – Valores de porosidade agrupados de modo decrescente segundo as suas designações e respectivos valores de número de poros por cm ²	54
Tabela 3.7 – Distribuição dos sobreiros da Herdade de Monte Fava segundo três classes de qualidade	54
Tabela 3.8 – Valores de calibre agrupados de modo decrescente segundo as suas designações.....	55
Tabela 3.9 – Valores de porosidade agrupados de modo decrescente segundo as suas designações e respectivos valores do número de poros por cm ²	57
Tabela 3.10 – Valores de calibre agrupados de modo decrescente segundo as suas designações.....	58

Tabela 3.11 – Valores de porosidade agrupados de modo decrescente segundo as suas designações	59
Tabela 3.12 – Distribuição dos sobreiros da Companhia das Lezírias segundo três classes de qualidade	60
Tabela 3.13 – Valores de calibre da Herdade da Espirra agrupados segundo as suas designações.....	61
Tabela 3.14 – Valores de porosidade da Herdade da Espirra agrupados segundo as suas designações e respectivos valores do número de poros por cm ² .	63
Tabela 3.15 – Distribuição dos sobreiros da Herdade da Espirra segundo três classes de qualidade	64
Tabela 3.16 – Sobreiros seleccionadas como produtoras de cortiça de boa qualidade nas 4 Herdades	65
Tabela B.1 – Valores de deslocamento, força de torção, binário e ângulo de torção para as três rolhas analisadas da amostra B4/14.....	89
Tabela D.1 – Primeira parte da matriz dos dados moleculares (NTSYSpc)	105
Tabela D.2 – Segunda parte da matriz dos dados moleculares (NTSYSpc)	106
Tabela D.3 – Primeira parte da matriz das características físicas (NTSYSpc)	107
Tabela D.4 – Segunda parte da matriz das características físicas (NTSYSpc)	108

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Sobreiro.....	1
Figura 1.2 – Montado de sobro da Companhia das Lezírias.....	2
Figura 1.3 – Flores masculinas, flores femininas e bolota.....	2
Figura 1.4 – Distribuição geográfica do sobreiro (<i>Quercus suber</i> L.) e sua expansão na região mediterrânica ocidental	3
Figura 1.5 – Distribuição de sobreiro pelos principais países produtores de cortiça a nível mundial.....	3
Figura 1.6 – Distribuição do sobreiro em Portugal	4
Figura 1.7 – Distribuição da produção de cortiça pelos principais países produtores a nível mundial.	5
Figura 1.8 – Tipos de cortiça: 1 – Cortiça virgem – Primeira tirada de cortiça ao fim de 25 anos; 2 – Cortiça secundeira – Segunda tirada de cortiça ao fim de 34 anos; 3 – Cortiça de reprodução – Terceira tirada de cortiça ao fim de 43 anos	6
Figura 1.9 – Estrutura da periderme do sobreiro	7
Figura 1.10 – Esquema de um ensaio de torção de um provete cilíndrico em que τ é a tensão de corte, r é o raio e L é o comprimento do provete	9
Figura 1.11 – Composição química Cortiça	10
Figura 1.12 – Derivação da via de biossíntese das lenhinas a partir do tronco comum conduzindo aos polifenóis.....	11
Figura 2.1 – A – Vista aérea da localização do centro das parcelas e do Sobreiro M25; B – Aspecto do montado – Parcela B7.....	17
Figura 2.2 – A – Vista aérea da localização do centro das parcelas na Herdade de Palma; B – Aspecto do montado – Parcela VC2.....	17
Figura 2.3 – A – Vista aérea da localização do centro das parcelas na Companhia das Lezírias; B – Aspecto do montado – Parcelas MM, MPN e MPS	18
Figura 2.4 – A – Vista aérea da localização do centro das parcelas na Herdade da Espirra; B – Aspecto do montado – Parcelas MO, PMR e MR	18
Figura 2.5 – Fluxograma para os dados qualitativos. Programas que operam sobre as matrizes usadas no sistema de programas NTSYSpc	25
Figura 2.6 – Fluxograma para as características físicas. Programas que operam sobre as matrizes usadas no sistema de programas NTSYSpc.	33
Figura 3.1 – Perfis electroforéticos do DNA extraído	34
Figura 3.2 – Perfis electroforéticos dos produtos PCR amplificados com os <i>primers</i> PAL1 e PAL2.....	35

Figura 3.3 – Dendograma das 73 árvores, baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança	36
Figura 3.4 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 73 árvores no plano definido pela primeira e segunda componentes principais.....	37
Figura 3.5 – Dendograma das 19 árvores localizadas na Herdade de Monte Fava, baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança.....	38
Figura 3.6 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 19 árvores no plano definido pela primeira e segunda componentes principais.....	38
Figura 3.7 – Dendograma das 6 árvores localizadas na Herdade de Palma, baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança.....	39
Figura 3.8 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 6 árvores no plano definido pela primeira e segunda componentes principais.....	39
Figura 3.9 – Dendograma das 18 árvores localizadas na Companhia das Lezírias, baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança.....	39
Figura 3.10 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 18 árvores no plano definido pela primeira e segunda componentes principais.....	39
Figura 3.11 – Dendograma das 30 árvores localizadas na Herdade da Espirra, baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança.....	40
Figura 3.12 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 30 árvores no plano definido pela primeira e segunda componentes principais.....	40
Figura 3.13 – Perfis dos produtos PCR (PAL 21 e PAL22)	41
Figura 3.14 – Alinhamento das 3 sequências <i>forward</i> com 99% de semelhança, em que para os 527 nucleotídeos de extensão, existem 10 locais polimórficos.....	42
Figura 3.15 – Perfis dos produtos PCR (Proteínas dirigentes).....	43
Figura 3.16 – Alinhamento das 19 sequências <i>forward</i> com 97% de semelhança, em que para os 258 nucleotídeos de extensão, existem 13 locais polimórficos.....	44
Figura 3.17 – Alinhamento das 19 sequências peptídicas com 98% de semelhança, em que para os 82 aminoácidos, existem 4 locais polimórficos.....	45
Figura 3.18 – Gráfico de hidrofobicidade para as 19 sequências peptídicas pelo método de Kyte & Doolittle obtido com janela de 9 aa.....	45
Figura 3.19 – A – Gráfico de hidrofobicidade em função da posição do aa pelo método de Kyte and Doolittle obtido com janela de 9 aa para as proteínas da árvore B7/5 e da árvore B9/21. B e C – Gráficos parciais das hidrofobicidades em função da posição do aa compreendidas entre os aminoácidos 25 e 39 e entre os aminoácidos 59 e 71 para as proteínas B7/5 e 9/21.....	47

Figura 3.20 – Perfis dos produtos de PCR-SSCP em gel de MDE (8 sobreiros).....	48
Figura 3.21 – Perfis dos produtos de PCR-SSCP em gel de MDE (B7/5 e B9/21).....	48
Figura 3.22 – Representação gráfica das amostras da Herdade Monte Fava em função da densidade.....	52
Figura 3.23 – Representação gráfica das amostras da Herdade Monte Fava em função da força de torção.....	53
Figura 3.24 – Representação gráfica das amostras do Herdade Monte Fava em função do ângulo de torção.....	53
Figura 3.25 – Representação gráfica das amostras da Herdade da Palma em função da densidade.....	56
Figura 3.26 – Representação gráfica das amostras da Herdade de Palma em função da força de torção.....	56
Figura 3.27 – Representação gráfica das amostras do Herdade de Palma em função do ângulo de torção.....	56
Figura 3.28 – Representação gráfica das amostras da Companhia das Lezírias em função da densidade.....	58
Figura 3.29 – Representação gráfica das amostras da Companhia das Lezírias em função da força de torção.....	59
Figura 3.30 – Representação gráfica das amostras da Companhia das Lezírias em função do ângulo de torção.....	59
Figura 3.31 – Representação gráfica das amostras da Herdade da Espirra em função da densidade.....	61
Figura 3.32 – Representação gráfica das amostras da Herdade da Espirra em função da força de torção.....	62
Figura 3.33 – Representação gráfica das amostras da Herdade da Espirra em função do ângulo de torção.....	62
Figura 3.34 – Fenograma das 71 árvores baseado no método UPGMA aplicado à matriz de distâncias.....	66
Figura 3.35 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 71 árvores no plano definido pela primeira e segunda componentes principais.....	67
Figura 3.36 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 71 árvores no plano definido pela primeira e terceira componentes principais.....	68
Figura 3.37 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das duas primeiras componentes principais.....	69
Figura 3.38 – Projecções das 7 características morfológicas da cortiça, no plano da primeira e terceira componentes principais.....	69
Figura 3.39 – Alinhamento das 8 sequências peptídicas dos 8 sobreiros da Herdade do Monte Fava produtores de cortiça de boa qualidade.....	70

Figura A.1 – Calibre de uma prancha de cortiça.....	84
Figura A.2 – Microfotografia da secção transversal de um provete de cortiça virgem.	84
Figura A.3 – Regeneração de um felogénio gerando para o seu exterior células suberosas de cortiça e para o seu interior, células da feloderme	84
Figura A.4 – Precursores alifáticos da suberina	85
Figura A.5 – Precursores fenólicos da suberina	85
Figura A.6 – Esquema geral da biossíntese para os precursores dos domínios polialifáticos e polifenólicos da suberina.....	86
Figura A.7 – Modelo da estrutura da lenhina na cortiça.....	87
Figura C.1 – Dendograma da análise das características físicas da cortiça dos sobreiros da herdade Monte Fava.....	91
Figura C.2 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 18 árvores no plano definido pela primeira componente principal e pela segunda componente principal	92
Figura C.3 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 18 árvores no plano definido pela primeira componente principal e pela terceira componente principal	92
Figura C.4 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das duas primeiras componentes principais	93
Figura C.5 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano da primeira e terceira componentes principais	94
Figura C.6 – Dendograma da análise das características físicas da cortiça dos sobreiros da herdade de Palma	95
Figura C.7 – Dendograma da análise morfológica da cortiça dos sobreiros da Companhia das Lezírias	96
Figura C.8 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 18árvores no plano definido pela primeira componente principal e pela segunda componente principal	97
Figura C.9 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 18 árvores no plano definido pela primeira componente principal e pela terceira componente principal	97
Figura C.10 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das duas primeiras componentes principais	98
Figura C.11 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano da primeira e terceira componentes principais	99
Figura C.12 – Dendograma da análise das características físicas da cortiça dos sobreiros da herdade da Espirra	100

Figura C.13 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 29 árvores no plano definido pela primeira componente principal e pela segunda componente principal	101
Figura C.14 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 29 árvores no plano definido pela primeira componente principal e pela terceira componente principal	102
Figura C.15 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das duas primeiras componentes principais	103
Figura C.16 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano da primeira e terceira componentes principais	104
Figura F.1 – Marcador Ez Load Presicion Molecular Mass Standard.....	118
Figura F.2 – Marcador MassRuler, DNA Ladder, High Range	118
Figura F.3 – Marcador 100+500 bp DNA Ladder (O'RangeRuler)	118
Figura G.1 – Incubadora (HT INFORS AG)	119
Figura G.2 – Câmara estéril	119
Figura G.3 – HOTE química (Flores Valles).....	119
Figura G.4 – Analisador de imagens VersaDOC (BIO-RAD)	119
Figura G.5 – Centrífuga (HERMLE Z 233 K).....	119
Figura G.6 – Centrífuga (HERMLE Z 383 K).....	119
Figura G.7 – Termociclador (Modelo Biometra T Gradient)	120
Figura G.8 – Termociclador (Modelo PCR Express Hybaid)	120
Figura G.9 – Tina para electroforese em géis de agarose (BIO-RAD)	120
Figura G.10 – Espectrofotometro (BIO-RAD SmartSpec 3000)	120
Figura G.11 – Tinas verticais para electroforese	120
Figura G.12 – Paquímetro para medição de espessuras	121
Figura G.13 – Medição da humidade da cortiça	121
Figura G.14 – Serra de fita para cortar a cortiça em provetes	121
Figura G.15 – Lixa e ar comprimido para uniformizar e limpar a superfície do provete, respectivamente	121
Figura G.16 – Máquina "cega" para brocar rolhas	121
Figura G.17 – Prensa para a realização dos ensaios de torção das rolhas	121

Siglário

ADE – Água biDestilada Estéril

AGE – Agarose Gel Electrophoresis (Electroforese em gel de agarose)

ANG – Ângulo de torção

APS – Ammonium Persulphate (persulfato de amónio)

bp – base pair (par de bases)

CAL – Calibre

CoA – Coenzima A

DAP – Diâmetro à altura de peito

DEN – Densidade

DNA – DeoxyriboNucleic Acid (ADN – Ácido desoxirribonucleico)

ddNTP - dideoxyriboNucleoside TriPhosphate (Desoxirribonucleosídeo 5'-trifosfatado)

dNTP – deoxyriboNucleoside TriPhosphate (Desoxirribonucleosídeo 5'-trifosfatado)

dsDNA – double-stranded Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla)

EDTA – EthyleneDiamineTetracetic Acid (Ácido etilendiamino tetracético, sal dissódico)

FAO – Food and Agriculture Organization (Organização para a agricultura e alimentação)

FOR – Força de torção

HUM – Humidade

MDE –Mutation Detection Enhancement

mRNA – messenger Ribonucleic Acid (ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro)

MST – Minimum Spanning Tree (Árvore de conexão mínima)

MVC – Matriz dos Valores Cofenéticos

NADP⁺ – Nicotamine Adenine Dinucleotide Phosphate, oxidized from
(forma oxidada do fosfato do) dinucleótideo de adenina, nicotinamida)

NADPH – Nicotamine Adenine Dinucleotide Phosphate, reduced from
(forma reduzida do fosfato do) dinucleótideo de adenina, nicotinamida)

NP/ cm² – Número de poros por cm²

OTUs – Operational Taxonomic Units

PAL – Phenilalanine Ammonia-Lyase (fenilalanina amónia-liase)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reacção da polimerase em cadeia)

POR – Porosidade

RNA – Ribonucleic Acid (ARN – Ácido ribonucleico)

RNase – RiboNucleAse (Ribonuclease)

RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacção da polimerase em cadeia de transcrição reversa)

SDS – Sodium Dodecyl Sulphate (Dodecil-sulfato de sódio)

SNPs – Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo em um Único Nucleótido)

SPAD – Suberin Poly (Aliphatic) Domain (Domínio polialifático da suberina)

SPPD – Suberin Poly (Phenolic) Domain (Domínio polifenólico da suberina)

SSCP – Single Strand Conformation Polymorphism (Polimorfismo de conformação de cadeia simples)

Taq – *Termus aquaticus*

TBE – Tris-Borate-EDTA (Solução tampão Tris-borato EDTA)

TEMED – NNN'N'-TetraMethylEthyleneDiamine (NNN'N'-tetrametilenodiamina)

TE – Tris-EDTA (Solução tampão Tris-EDTA)

Tris – Tris (hydroxymethyl) aminomethan (tris(hidroximetil)aminometano)

UPGMA – Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Augrages

UV – Ultra-Violeta

1. Introdução

1.1. Caracterização do Sobreiro

O sobreiro, *Quercus suber* L. (Figura 1.1), é uma quercínea de folha persistente, pertencente à ordem *Fagales*, à família *Fagaceae*, ao género *Quercus* e à espécie *Quercus suber*. Esta espécie distingue-se das restantes da sua família, principalmente pela espessura volumosa da casca de tecido suberoso, a cortiça, na qual reside actualmente o principal interesse económico da sua utilização industrial.



Figura 1.1 – Sobreiro [1]

O sobreiro é uma espécie que ocorre naturalmente entre as latitudes de 34º e 45ºN, sendo deste modo, uma espécie bem adaptada ao clima mediterrânico, o qual é caracterizado por períodos de seca estival e Invernos amenos. Relativamente à sua origem, julga-se que o sobreiro seja do período Oligocénico-Miocénico, sendo relativamente novo dentro dos carvalhos (Fortes *et al.*, 2004 e Vinagre *et al.*, 2005).

Esta espécie caracteriza-se por possuir um crescimento lento, podendo ter uma grande longevidade, a qual está compreendida entre os 250 e os 350 anos. Apesar de o sobreiro ter um período de vida longo, tendo em alguns casos chegado aos 400 anos, considera-se, que, a idade limite para produção de cortiça seja entre 150 a 200 anos (Fortes *et al.*, 2004). O sobreiro adulto pode atingir, em média, 15 a 20 metros de altura e, em casos extremos, os 25 metros de altura e caracteriza-se por ter um tronco curto e grosso que começa a ter bifurcações a uma pequena altura do solo, em pernadas principais de ângulo aberto, revestidas por vários ramos e por uma vasta folhagem (Costa, *et al.*, 2003).

Esta espécie, com características peculiares, essencialmente alogâmica e tipicamente heterozigótica, possui um elevado polimorfismo, originando, por isso, populações muito 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 (Natividade, 1950).

Deste modo, devido à complexa constituição genética do sobreiro, não existe uma reprodução fiel dos caracteres dos progenitores, observando-se na descendência de cada sobreiro diferenças morfológicas muito salientes de árvore para árvore,

particularmente nas características do tecido suberoso, no vigor e na arborescência das árvores, na produtividade e na dimensão dos seus frutos. De tal modo, que, o seu elevado polimorfismo levou Vieira Natividade a admitir que, em rigor, cada árvore podia ser considerada uma forma botânica distinta (Natividade, 1950).

O sobreiro é uma árvore dominante nos sistemas agro-florestais, denominados de montados. Estes montados têm forte intervenção humana, onde coexistem dois sistemas em paralelo: um sistema correspondente à produção de cortiça e o outro correspondente ao pastoreio e culturas agrícolas. Esta conjugação de diferentes sistemas, conduz a um tipo de sistema de povoamentos abertos com baixa densidade de árvores por hectare, cerca de 50 a 150 (Figura 1.2) (Fortes *et al.*, 2004).

Os sobreiros dos montados são regularmente submetidos a intervenções culturais, das quais se destacam o desbaste e as podas de formação. Ambas têm a função de favorecer o desenvolvimento do sobreiro e garantir um tronco mais alto, cerca de 2 a 3 metros, bifurcado com 2 a 3 pernas principais grossas e uma menor copa (Fortes *et al.*, 2004).



Figura 1.2 – Montado de sobreiro da Companhia das Lezírias.

Em Portugal, o período de actividade fisiológica do sobreiro tem habitualmente início nos meses de Fevereiro e Março, altura em que aparecem os primeiros gomos foliares. O engrossamento do sobreiro, ou seja, o crescimento radial da árvore, ocorre de Março a Outubro, sendo o período de Maio a Junho aquele em que a taxa de crescimento é maior. É neste período que ocorre o aparecimento e crescimento de novas folhas, mantendo-se estas folhas potencialmente activas ao longo do Outono e do Inverno até caírem durante a Primavera (Fortes *et al.*, 2004). O sobreiro é uma folhosa de folha persistente, com uma floração sub-contínua, a qual ocorre durante o período de Abril a Junho, e dá origem a flores masculinas (Figura 1.3a) delgadas e longas - os amentilhos - e a flores femininas (Figura 1.3b) que podem dar origem a três tipos de frutificação - o bastão, a lande ou bolota e o landisco, sendo a bolota a principal das três (Figura 1.3c) (Vinagre *et al.*, 2005).

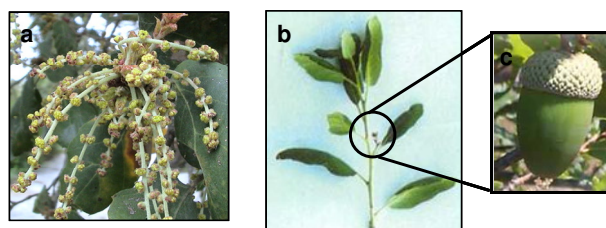


Figura 1.3 – (a) Flores masculinas. (b) Flores femininas. (c) Bolota [2]

1.2. Distribuição do Sobreiro

O sobreiro é uma espécie comum e característica da região mediterrânica ocidental, desde o sul da Europa até ao norte de África e sobretudo no quadrante sudoeste da Península Ibérica (Natividade, 1950). Actualmente, a área geográfica de distribuição ocupada pelo sobreiro, estende-se para o Atlântico, a norte pelo Sul da Europa e a sul pelo Norte de África, essencialmente na parte Ocidental e no Litoral do Mediterrâneo (Figura 1.4) (Fortes *et al.*, 2004).



Figura 1.4 – Distribuição geográfica do sobreiro (*Quercus suber* L.) e sua expansão na região mediterrânica ocidental [3].

O sobreiro ocupa uma área total de 2,3 milhões de hectares, dos quais 33% se distribuem em Portugal, seguido da Espanha com 22%, o norte de África com 37% (fundamentalmente países como a Argélia, Marrocos e a Tunísia), Itália e França representam os 8% restantes (Figura 1.5) (Fortes *et al.*, 2004).

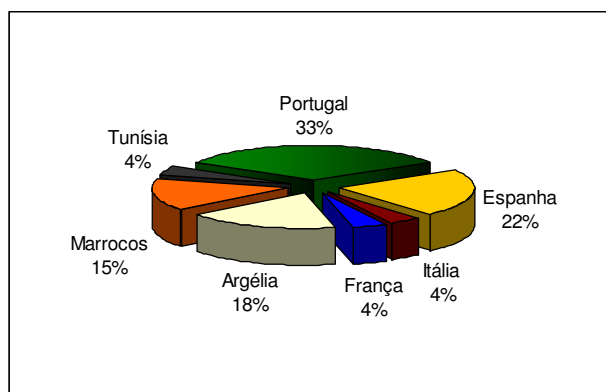


Figura 1.5 – Distribuição de sobreiro pelos principais países produtores de cortiça a nível mundial [4].

Portugal é o país de eleição para o sobreiro e, embora vegete em boas condições em quase todo o território nacional, predomina na região centro-sul, ou seja, a sul do rio Tejo, nos distritos de Setúbal, Évora, Beja, Portalegre e Santarém e na zona de Bragança (Figura 1.6). Segundo o Inventário Florestal Nacional apresentado pela Direcção Geral dos Recursos Florestais, a área total ocupada pelo sobreiro em Portugal é de 736 700 hectares, 80% dos quais em povoamentos puros e 20% em povoamentos mistos. Deste modo, o sobreiro ocupa cerca de 22% da área total de floresta em todo o país, constituindo actualmente a espécie com maior ocupação de área (DGRF, 2007).

Como se pode observar na Figura 1.6, cerca de um quinto da superfície de Portugal é ocupada por sobreiro, o que faz com que o nosso país surja como primeiro produtor mundial de cortiça.



Figura 1.6 – Distribuição do sobreiro em Portugal [1].

1.3. Importância económica

A importância económica da exploração dos montados reside essencialmente na produção de cortiça. O sector da cortiça é o único onde Portugal tem a primeira posição a nível mundial em vários domínios: na produção mundial da cortiça detém mais de metade da produção (57%); na produção industrial detém 60% do valor da produção mundial de produtos de cortiça transformados e nas exportações detém mais de dois terços das exportações mundiais em volume de produtos transformados.

Assim, em Portugal, o montado de sobreiro detém um lugar de destaque, não só pela importância económica que a fileira sobreiro / cortiça tem no nosso País (cerca de 3% do PIB Nacional, mais de 900 milhões de euros de exportação anual), mas também pela representatividade da nossa floresta de sobreiro (22% da área florestal nacional), fornecendo cerca de 57% da produção mundial de cortiça. Portugal tem assim uma posição dominante em todo o processo, desde a produção até à transformação e comercialização.

Num montado convenientemente explorado, a qualidade da cortiça começa a declinar após 150 a 200 anos, idade considerada como limite da cultura económica do sobreiro. Um sobreiro adulto, normalmente desenvolvido, pode produzir em cada extracção entre 40 e 60 Kg de cortiça [4].

Tal como foi anteriormente referido, actualmente Portugal tem uma área florestada de sobreiro de 736 700 hectares. Portugal tem vindo a proceder a

importantes reflorestações, no período de 1990 a 1998 plantaram-se mais de 100.000 hectares, o que correspondeu a um aumento de cerca 16% e, conseqüentemente, a um acréscimo significativo na produção e exportação de cortiça (Tabela 1.1) [5].

Tabela 1.1 – Evolução das exportações portuguesas de cortiça entre 1990 e 1998.

Ano	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
Valores (Milhões de euros)	401.0	400.0	407.0	434.0	481.3	509.8	551.2	642.0	714.3
Valores (Toneladas)	105.6	102.0	107.0	116.6	120.9	122.5	122.3	131.6	136.5

A rolha de cortiça natural é o produto com maior importância, correspondendo, em média, a 51% da produção mundial (Figura 1.7) o que corresponde a cerca de 155 000 toneladas/ano [4 e 6].

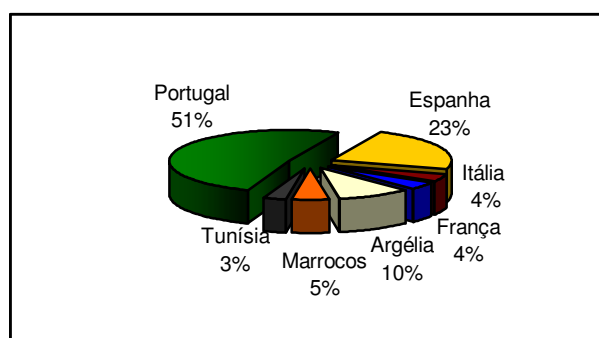


Figura 1.7 – Distribuição da produção de cortiça pelos principais países produtores a nível mundial [4].

Para além da sua inquestionável importância económica de uso directo, os montados de sobre têm também um valor de uso indirecto, nomeadamente pelo papel ecológico que desempenham: promovem a retenção de água e fixação de carbono; impedem a desertificação e a erosão do solo; auxiliam na protecção contra incêndios e sustentam um dos mais altos níveis de biodiversidade observados no mundo.

A floresta de sobre é supervisionada pelo Ministério da Agricultura, com leis específicas à sua protecção rectificadas na Assembleia da República, acrescidas pelo apoio da União Europeia, o que permite manter e sustentar o crescimento da floresta.

Em 1996, a FAO (Food Agriculture Organization) através do programa “*Country Report for Portugal*” enunciava que: “para manter o seu papel crucial no ecossistema, o sobreiro deverá ser considerado uma espécie ameaçada”. Como consequência deste e outros estudos, os produtores, industriais e organismos governamentais uniram-se na reflorestação da área suberícola e no desenvolvimento e modernização dos processos produtivos de cortiça e outros produtos.

1.4. A cortiça

A cortiça é um parênquima suberoso, produzido pelo meristema felodérmico da *Quercus suber*, muito homogéneo, constituído por células mortas de parede suberificada e dispostas de um modo compacto com notável regularidade, sem espaços livres, devendo-se as suas propriedades não só à sua singular estrutura, mas também à natureza das membranas celulares.

A primeira extracção de cortiça realiza-se ao fim de 25 anos de vida da árvore, quando o perímetro do tronco sobre a cortiça à altura de 1,30 m do solo é superior a 70 cm (diâmetro à altura de peito - DAP) (Decreto nº 27 776 de 24 de Junho de 1937), e, tem a denominação de cortiça virgem. Na segunda extracção, a cortiça é conhecida por secundeira, terá de ser respeitado um intervalo mínimo de 9 anos, bem como nos descortiçamentos seguintes. Apenas a partir do terceiro descortiçamento, é que se aproveita a melhor cortiça, a amadia, para o fabrico de rolhas. Assim, no período de vida do sobreiro a cortiça assume três tipos diferentes (Figura 1.8).

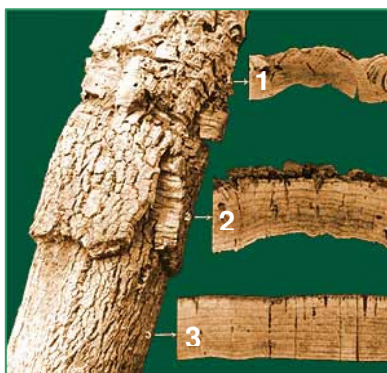


Figura 1.8 – Tipos de cortiça: **1** – Cortiça virgem – Primeira tirada de cortiça ao fim de 25 anos; **2** – Cortiça secundeira – Segunda tirada de cortiça ao fim de 34 anos; **3** – Cortiça de reprodução – Terceira tirada de cortiça ao fim de 43 anos. [7].

O descortiçamento deve ser efectuado nos meses de actividade vegetativa, Junho a Agosto, durante os quais a cortiça se solta com maior facilidade, dado que é nesta época que se estão a gerar novas células de cortiça, as quais têm uma parede celular mais frágil. Deste modo, a separação da cortiça ocorre por ruptura ao nível da felogene (Figura 1.9).

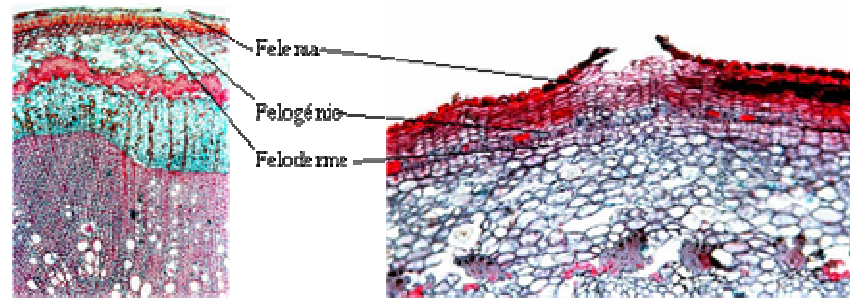


Figura 1.9 – Estrutura da periderme do sobreiro [7].

O conhecimento da qualidade da cortiça e do seu justo valor depende muito da avaliação efectuada. Para além deste facto, temos ainda os problemas associados à comercialização da cortiça, motivados pela diferenciação regional de preços em função da qualidade de cortiça, pela irregularidade da produção anual de cortiça e um conjunto de outros factores que dizem respeito ao mercado (a fixação dos preços em regime livre, nem sempre é de acordo com a conjuntura de mercados externos), ao número elevado de participantes na comercialização (produtores, comerciantes, industriais, exportadores, consumidores) e o facto da oferta de cortiça ser pouco variável em relação aos preços (devido à impossibilidade de aumentar a produção a curto prazo) (Gil, L., 1998).

Na comercialização da cortiça, o seu preço é determinado tomando em conta a espessura e a qualidade das cortiças. Dado que a humidade pode influenciar o preço da cortiça, deve-se tomar como valor base 14% (Reis, A., 1995).

Por outro lado, a escolha da cortiça requer grande especialização na separação de cortiça em classes, com os principais requisitos de selecção, ou seja, a qualidade e a espessura (Pereira, H., 1993 e Fortes *et al.*, 2004).

Pelo que foi referido anteriormente, as características estudadas para determinar morfológicamente a qualidade da cortiça foram:

- **Calibre:**

Como tem vindo a ser referido, a idade de criação da cortiça, nove anos, permite em geral a obtenção de pranchas de cortiça com espessura suficiente para poderem ser brocadas as rolhas. Os crescimentos de cortiça entre os diferentes locais geográficos de Portugal apresentam diferenças importantes, em consequência das diferentes condições climáticas e do solo. Estas diferenças traduzem-se na variabilidade de crescimento da cortiça entre árvores numa mesma zona, o que leva a

que a produção de um montado contenha pranchas de cortiça com diversos calibres (espessura da prancha) (Anexo A. – Figura A.1) (Taco *et al.*, 2004). O calibre das pranchas depende da variabilidade da largura dos anéis anuais de crescimento, que se situa entre 1 e 6 mm, sendo que a cortiça virgem é a que apresenta um menor calibre. Em Portugal, o calibre médio de pranchas de cortiça com 9 anos retiradas de sobreiros em diferentes localizações está entre 22 a 44 mm (Fortes *et al.*, 2004).

Na indústria, as pranchas de cortiça amadia são classificadas atendendo ao seu calibre e também à sua qualidade, cuja principal característica é a porosidade. Isto deve-se ao facto de o calibre ser o factor limitante para os processos tecnológicos das pranchas, ou seja, para a produção de rolhas de cortiça (Pereira, H., 1999).

■ Densidade:

A cortiça é um tipo de material celular natural com uma densidade muito variável. Esta, é dependente do tipo de cortiça, amadia ou virgem, ou do tipo de tratamento a que a cortiça é submetida, sendo o mais significativo a cozedura (Fortes *et al.*, 2004). Geralmente, são referidos valores para a densidade da cortiça entre 120 a 300 kg/m³ (Pestana da Silva, 2003).

A densidade global (ρ) de um determinado material celular está relacionada com a densidade do material constituinte das paredes celulares (ρ_s) e com a geometria das células, ou seja, a fracção em volume ocupada pelas paredes celulares (f), originando a seguinte relação (Fortes *et al.*, 2004):

$$\frac{\rho}{\rho_s} = 1 - f \quad (\text{Equação 1.1})$$

A densidade do material constituinte das paredes celulares é sensivelmente a mesma para todas as cortiças, devido ao facto de que a composição química da cortiça não varia significativamente com o tipo de cortiça nem com a operação de cozedura a que é submetida. O valor considerado para ρ_s é de 1150 kg/m³, que é o valor típico dos materiais poliméricos e foi estimado com base na densidade dos diferentes componentes químicos da cortiça (Fortes *et al.*, 2004).

Contrariamente à composição química da cortiça, a geometria das células varia significativamente com o tipo de cortiça. No caso da cortiça virgem, as fortes tensões de compressão resultantes do crescimento radial, que são geradas nos primeiros anos de vida do sobreiro, levam a que as paredes celulares se encontrem fortemente onduladas (Anexo A. – Figura A.2). Resultante deste facto, para o mesmo sobreiro, a

densidade da cortiça virgem é cerca de 15 a 20% superior à da cortiça amadia (Fortes *et al.*, 2004; Gibson, *et al.*, 1997).

A geometria celular da cortiça também varia com a época do ano em que são geradas. Mais concretamente, o ciclo anual do sobreiro divide-se em duas fases: a vegetativa, do início da Primavera até ao fim do Outono e a fase de repouso invernal em que o felogénio não se encontra em actividade. Assim, as células geradas na fase final de actividade do felogénio (Julho a Novembro) são mais curtas radialmente, apresentando paredes mais espessas, contrariamente às células que são geradas no início do período de actividade do felogénio (Abril a Junho) (Fortes *et al.*, 2004).

Outro factor, do qual depende a densidade da cortiça, é a maior ou menor existência de poros (canais lenticulares) e que, quanto mais ociosos estes poros forem menor é a densidade da cortiça (Fortes *et al.*, 2004).

■ Ensaio da força e do ângulo de torção:

Embora a cortiça, na maioria das suas aplicações seja submetida a esforços de compressão, há também casos em que a deformação da cortiça resulta essencialmente da aplicação de tensões tangenciais como é o caso da torção (por exemplo, na remoção de uma rolha de champanhe) (Fortes *et al.*, 2004).

Num ensaio de torção, aplica-se um determinado binário ou momento torsor que origina uma deformação angular, em consequência da qual, no caso de um provete cilíndrico (por exemplo, uma rolha de vinho), os topos do provete sofrem uma distorção, inclinando-se em sentidos opostos em relação à sua posição original. No esquema da Figura 1.10 encontra-se representado um ensaio de torção de um provete cilíndrico. O binário aplicado origina no interior do material tensões de corte que se lhe opõem, levando ao seu equilíbrio. Apesar da tensão de corte variar de ponto para ponto, esta depende apenas do raio do provete cilíndrico (Fortes *et al.*, 2004, Rosa, M., 1991 e Andrade, A., 1984).

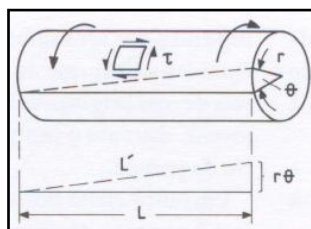


Figura 1.10 – Esquema de um ensaio de torção de um provete cilíndrico em que τ é a tensão de corte, r é o raio e L é o comprimento do provete.

- **Porosidade:**

O felogénio tem uma actividade meristemática gerando para o seu exterior células que se diferenciam como células suberosas de cortiça e, para o seu interior, células da feloderme (Anexo A. – Figura A.3). A partir do felogénio para o seu exterior, também se formam zonas de felogénio lenticular cuja actividade leva à formação dos canais lenticulares com o seu tecido de enchimento, os quais constituem a característica principal das pranchas de cortiça amadia. Estes canais lenticulares, que têm uma secção transversal aproximadamente circular, representam a designada porosidade da cortiça (Costa, *et al.*, 2004). Como foi referido anteriormente, estes canais são um dos parâmetros determinantes para definir a qualidade da cortiça. Estes canais lenticulares desenvolvem-se radialmente na cortiça, formando canais aproximadamente cilíndricos que atravessam a cortiça desde o felogénio até à superfície exterior da camada de cortiça (Fortes *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 1987).

1.5. Biossíntese da suberina e da lenhina

A composição química da cortiça tem como principal constituinte, a suberina (45%), contendo também a lenhina (27%), a celulose e os polissacáridos (12%) e compostos extractáveis como taninos (6%), ceróides (5%), cinzas e outros produtos (5%) (Figura 1.11).

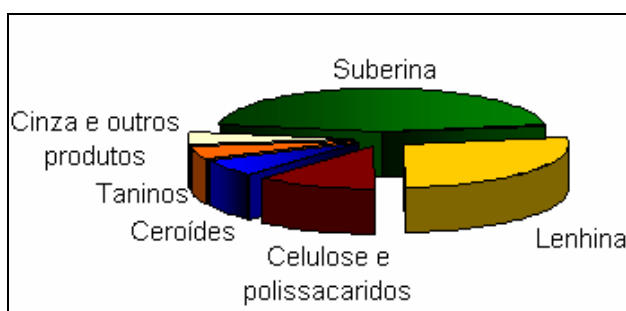


Figura 1.11 Composição química Cortiça [1].

As plantas vasculares aparecem de forma clara na escala da evolução há cerca de 420 a 450 milhões de anos. Até atingirem esta fase evolutiva, as plantas vasculares sofreram modificações, não apenas a nível morfológico e reprodutor, como a nível bioquímico. Estas vias bioquímicas desenvolveram-se a partir de aminoácidos

aromáticos, cuja síntese é comum tanto nos microorganismos como nas plantas. No entanto, apenas alguns grupos vegetais foram capazes de desenvolver etapas bioquímicas ulteriores que, através da desaminação da fenilalanina e da tirosina, possibilitam a síntese de compostos em C₆-C₃, os fenilpropanos, e os seus polímeros, os polifenóis (Carrapiço, F., 1998). Os ácidos cinâmico e p-cumárico, obtidos respectivamente da fenilalanina e da tirosina, constituem o início de duas importantes vias de síntese nos vegetais: a dos polifenóis e a das lenhinas (Figura 1.12).

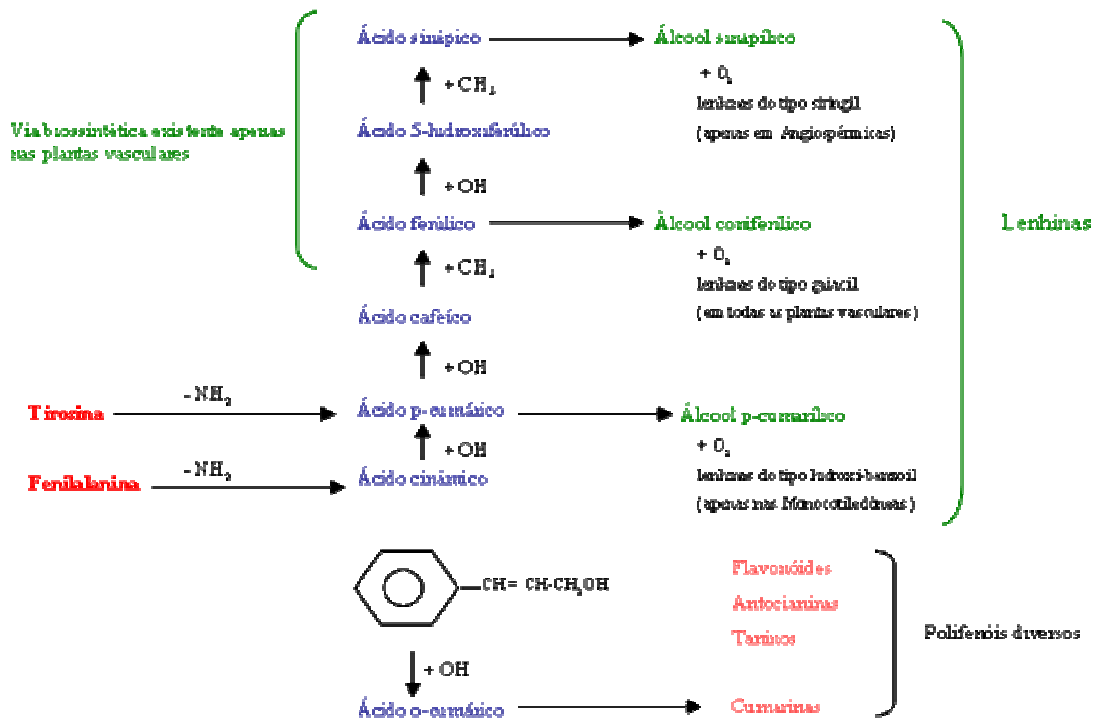


Figura 1.12 – Derivação da via de biossíntese das lenhinas a partir do tronco comum conduzindo aos polifenóis (Carrapiço, F., 1998).

Uma grande variedade de reacções bioquímicas permite a síntese de compostos polifenólicos, presentes em diversos grupos de organismos, que vão desde os cogumelos até aos cormófitos, passando pelas algas da divisão Charophyta. Estes compostos, de natureza polimérica, são baseados em unidades de fenilpropano, e intervêm a diversos níveis nas relações entre um vegetal e o seu ambiente biótico ou abiótico, desempenhando um papel muito importante nos diversos mecanismos relacionados com a defesa dos vegetais.

1.5.1. A suberina

O termo suberina é utilizado para definir um componente celular específico da cortiça, cuja estrutura permanece ainda relativamente desconhecida. Porém, sabe-se que a suberina contém 2 domínios, um alifático ligado covalentemente por ligações ésteres a outro fenólico e que o glicerol participa nas suas regiões esterificadas (Stark & Garbow, 1992; Neto *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 2000a, 2000b).

Neste contexto, de entre os vários estudos realizados com suberinas extraídas de diferentes plantas, realça-se o de Kolattukudy (relatado em 1978 tal como citado por Cordeiro *et al.*, 1997 e 1998) em que, para a composição química da suberina da epiderme da batata, propôs um modelo tentativo. Neste modelo, longas regiões (domínios) alifáticas ligam-se covalentemente por ligações ésteres a domínios fenólicos, permanecendo a suberina *in situ* como uma rede macromolecular.

A degradação da suberina da cortiça origina, como principais produtos, ácidos gordos insaturados de elevada massa molecular enquanto, pelas suas regiões fenólicas com características semelhantes às da lenhina, o remanescente da suberina permanece insolúvel nas soluções aquosas mas solúvel em compostos orgânicos tais como clorofórmio e α -bromonaftaleno (Cordeiro *et al.*, 1997 e 1998).

Assim, ainda de acordo com o modelo proposto por Kolattukudy, os domínios alifáticos, hidrofóbicos (lipídicos) esterificados com as regiões fenólicas, com características físico-químicas semelhantes às da lenhina, formam uma matriz (rede) acamada também designada por lamela de suberina (Lulai e Morgan, 1992).

Os domínios fenólicos da suberina, sendo principalmente constituídos por polímeros fenólicos derivados de ácidos hidroxicinâmicos em vez dos correspondentes álcoois encontrados na lenhina, contêm um teor significativo de cruzamentos covalentes que, não sendo ligações ésteres, interligam os monómeros fenólicos da suberina (Bernards *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 2000a., 2000b).

O domínio polialifático dos tecidos suberizados (SPAD) é constituído por um conjunto de componentes alifáticos específicos e, em muitos casos únicos (Anexo A. – Figura A.4). Estimativas com base em análises de cortiça em *Quercus suber* atribuem 40 a 50% do peso seco das células suberizadas ao SPAD (Marques *et al.*, 1994; Graça & Pereira, 1997). De acordo com Matzke e Riederer (1991) os ácidos α , ω -dióicos são únicos nos tecidos suberizados, e podem ser utilizados como marcadores diagnósticos para os distinguir de tecidos cutinizados. A composição do SPAD e de ceras dos tecidos suberizados considera-se como sendo conhecida, mas como adiante veremos, há ainda muito por descobrir acerca da sua biossíntese e formação *in vivo*.

A composição química do domínio polifenólico dos tecidos suberizados (SPPD) foi matéria de controvérsia (Bernards & Lewis, 1998). Tendo sido inicialmente incorporados nas lenhinas, é constituído por uma rede tridimensional de monolinhões oxidativamente acoplados, tais como os precursores da Figura A.5, Anexo A..

No entanto, foi recentemente demonstrado que SPPD possui também quantidades significativas de ácidos hidroxicinâmicos covalentemente interligados (Bernards *et al.*, 1995; Schreiber *et al.*, 1996) e seus derivados (por exemplo, feruloiltiramina) (Negrel *et al.*, 1996). Isto é importante na medida em que implica passos biossintéticos alternativos, que podem ser distintos dos envolvidos na lenhificação. A estrutura macromolecular geral do SPPD assemelha-se à das lenhinas, possuindo contudo uma composição monomérica mais heterogénea. No Anexo A., Figura A.6, apresenta-se um esquema geral para a biossíntese dos precursores SPAD e SPPD que representa o conhecimento adquirido para diferentes espécies de plantas, principalmente batata e milho (Bernards, 2002).

1.5.2. A lenhina

As lenhinas encontram-se especificamente nas plantas vasculares (tracheophyta) e ocorrem selectivamente em maior quantidade nas paredes celulares de tipos particulares de células, que formam partes de tecidos lenhosos como as fibras, vasos xilémicos e traqueídeos e desempenham importantes papéis biológicos, dos quais se destacam a rigidez da parede celular, a redução da permeabilidade celular à água e os processos de defesa contra patogénicos. Elas representam o segundo composto orgânico mais abundante no planeta após a celulose, constituem 25% da biomassa vegetal (Higuchi, 1990) e constituem 30% do carbono orgânico em circulação na biosfera (Gang *et al.*, 1999).

A biossíntese das lenhinas dá-se ao longo de uma sequência de reacções que envolvem a via do shiquimato (que fornece a L-fenilalanina e a L-tirosina), a via fenilpropanóide comum que vai da L-fenilalanina (e/ou L-tirosina) aos p-hidroxicinamoil CoAs, e a via específica das lenhinas, que canaliza estes últimos para a síntese de monolinhões, e sua posterior polimerização nas paredes celulares, em reacções catalizadas por peroxidases (Whetten & Sederoff, 1995; Boerjan *et al.*, 2003).

A lenhina isolada da cortiça foi caracterizada estruturalmente para determinar os tipos de ligações intermonoméricas o que permitiu obter informação sobre a sua estrutura. Na Figura A.7 do Anexo A., apresenta-se o modelo de uma estrutura possível para a lenhina da cortiça, uma vez que se desconhecem ainda alguns aspectos relativos à funcionalização e à ligação intermonomérica (Fortes *et al.*, 2004).

As plantas são assim os únicos organismos vivos capazes de canalizar o carbono do metabolismo primário em direcção à biossíntese das lenhinas sendo largamente aceite que a aquisição evolutiva da via dos fenilpropanóides desempenhou um papel fundamental na capacidade das plantas de colonizarem o meio terrestre, não somente porque um dos produtos da via (as lenhinas) fornece sustentabilidade aos órgãos aéreos da planta, mas também porque outros produtos (os flavonóides) lhes conferem protecção contra a perigosa radiação ultra-violeta.

1.6. Enzimas envolvidas na síntese da suberina e da lenhina e proteínas dirigentes

1.6.1. Fenilalanina amónia-liase (PAL)

Nas diferentes etapas dos mecanismos bioquímicos de polimerização da suberina e da lenhina estão envolvidos genes codificantes de proteínas (enzimáticas e estruturais) envolvidas na síntese, manutenção e arquitectura da suberina e da lenhina.

A fenilalanina amónia-liase (PAL) é uma enzima fundamental no metabolismo secundário das plantas superiores catalizando a desaminação não-oxidativa da L-fenilalanina em ácido transcinâmico. A PAL é assim, potencialmente, uma enzima reguladora chave, catalizando o passo inicial comum na biossíntese dos fenilpropanóides. Os produtos desta via são estrutural e funcionalmente diversos e são sintetizados em resposta quer a factores de desenvolvimento quer ambientais (Dixon e Paiva, 1995; Hahlbrock e Scheel, 1989).

O controlo desta via pode então ocorrer pela regulação da transcrição da PAL em resposta a esses factores (Liang *et al.*, 1989; Shufflebottom *et al.*, 1993; Kumar e Ellis, 2001), por inibição por “feedback” da actividade metabólica da PAL e pela expressão de múltiplas isoproteínas. As isoformas da PAL são modificadas pós-traducionalmente (Bolwell, 1992; Allwood *et al.*, 1999), apresentam sensibilidade metabólica diferencial (Sarma *et al.*, 1998) e associam-se preferencialmente com complexos metabólicos de canalização (Rasmussen e Dixon, 1999). A acção de patogénios, ferimentos e radiação ultra-violeta está intimamente relacionada com um rápido aumento na transcrição dos genes *pal* (Lois, *et al.*, 1989; Ni, *et al.*, 1996).

Tipicamente, a PAL é codificada por uma pequena família multigénica, o que está de acordo com a primeira demonstração de múltiplas isoformas de PAL em

Phaseolus vulgaris (Bolwell *et al.*, 1985). A batata parece ser uma excepção, com mais de 40 cópias identificadas (Joos & Hahlbrock, 1992), enquanto a *Arabidopsis thaliana* possui apenas quatro putativas isoenzimas PAL em que *Atpal 1* tem sido proposta como envolvida na lenhificação desta espécie (Mauch-Mani e Slusarenko, 1996; Rookes e Cahill, 2003).

Os genes *pal* das plantas partilham várias sequências muito conservadas codificantes de regiões peptídicas, uma das quais inclui o putativo local activo da enzima (Schuster e Retey, 1994).

1.6.2. Proteínas Dirigentes

Da escassa informação existente da biossíntese da suberina e da lenhina, é previsto que a polimerização de monómeros constituintes da parede celular ocorra de um modo organizado. O facto desta polimerização resultar numa estrutura altamente regular ocorre devido ao envolvimento das chamadas proteínas dirigentes.

O modelo proposto para a síntese da lenhina era referido como um processo aleatório e descontrolado, ou seja, a ligação daqueles monómeros podia ocorrer em diferentes locais moleculares e/ou celulares. Porém, com a descoberta das proteínas dirigentes surgiu um novo modelo para a polimerização controlada dos monolinóis (Davin *et al.*, 1997; Gang *et al.*, 1999; Davin & Lewis, 2000), em que as proteínas dirigentes, não apresentando qualquer actividade enzimática (Davin & Lewis, 2000), no entanto orientam estereo-selectivamente aqueles monómeros para locais específicos entre a membrana citoplasmática e a parede celular onde, na presença de oxidase e/ou peroxidase que também aí ocorre(m), são convertidos em (+)-pinoresinóis que depois, sob acção da (+)-pinoresinol-(+)-lariciresinol reductase dependente da NADPH, sofrem polimerização conducente à síntese da lenhina (Fujita *et al.*, 1999).

Objectivos

A qualidade da cortiça é influenciada por factores ambientais, culturais e genéticos e, por isso, a cortiça apresenta uma grande variabilidade quantitativa e qualitativa, não só de região para região, de zona para zona como, inclusivamente, entre diferentes sobreiros da mesma zona.

O presente trabalho é uma contribuição, fundamentalmente, para os factores genéticos e pretende aprofundar o conhecimento da variabilidade genética do sobreiro e estabelecer possíveis correlações entre os modelos da variabilidade genética e da variabilidade fenotípica da qualidade da cortiça.

Sabendo-se que os principais constituintes da cortiça são a suberina e a lenhina e atendendo ao conhecimento sobre o envolvimento de algumas enzimas nos processos de suberização e de lenhificação, constituem objectivos deste trabalho:

- Estudar a variabilidade genética de sobreiros localizados em parcelas seleccionadas em diferentes regiões através da caracterização de polimorfismos genómicos das regiões codificantes da fenilalanina amónia liase e de proteínas dirigentes, procurando-se detectar eventuais diferenças que permitam distinguir indivíduos e populações;
- Caracterizar morfologicamente a cortiça e estabelecer correlações entre sobreiros produtores de boa e má cortiça e a análise molecular.

2. Material e Métodos

2.1. Áreas de estudo

No âmbito dos Projectos PAMAF 4003 “Contribuição para o melhoramento do sobreiro” e AGRO 446 “Influência de modalidades de gestão na conservação/recuperação de montados de sobreiro, produção de cortiça e valorização ambiental”, foram seleccionadas e marcadas árvores adultas ($DAP > 90\text{cm}$), localizadas em parcelas com 0,28 ha implantadas na Herdade do Monte Fava em Ermidas-Sado (Figura 2.1), na Herdade de Palma (Vale Cascos) no Concelho de Alcácer do Sal (Figura 2.2), na Companhia das Lezírias no Concelho de Benavente (Figura 2.3) e na Herdade da Espirra no Concelho de Vendas Novas (Figura 2.4).

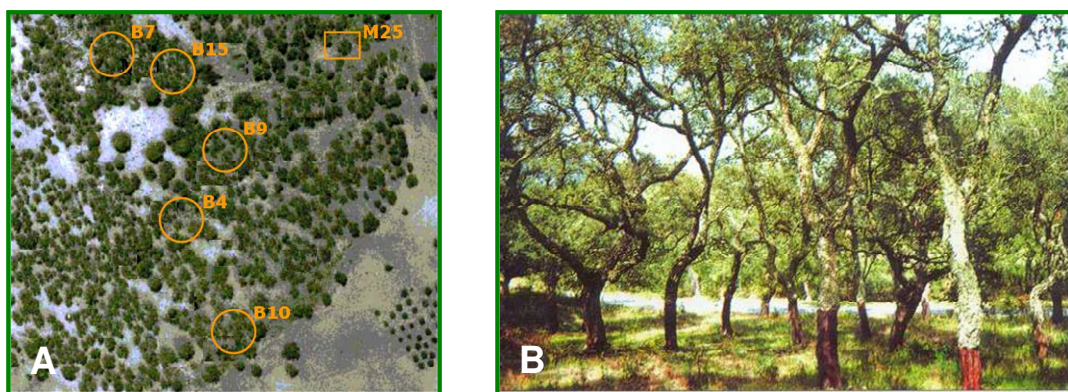


Figura 2.1 – A – Vista aérea da localização do centro das parcelas e do Sobreiro M25;
B – Aspecto do montado – Parcela B7.



Figura 2.2 – A – Vista aérea da localização do centro das parcelas na Herdade de Palma;
B – Aspecto do montado – Parcela VC2.

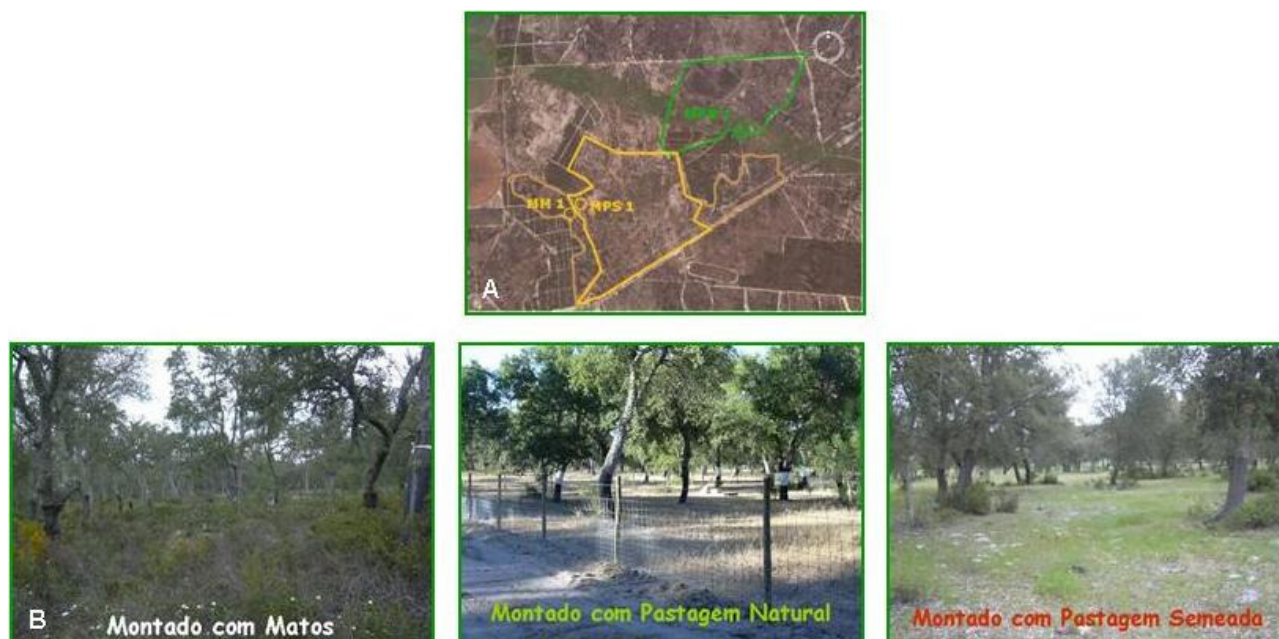


Figura 2.3 – A – Vista aérea da localização do centro das parcelas na Companhia das Lezírias;
 B – Aspecto do montado – Parcelas MM, MPN e MPS.



Figura 2.4 – A – Vista aérea da localização do centro das parcelas na Herdade da Espirra;
 B – Aspecto do montado – Parcelas MO, PMR e MR.

2.2. Material vegetal

A amostra sobre a qual incidiu o estudo incluiu 73 sobreiros e pranchas de cortiça de 71 árvores que durante o período de realização deste trabalho se encontravam no ano de descortiçamento.

Foram colhidas folhas jovens, com cerca de 15 dias de crescimento, das várias árvores (Tabela 2.1), que foram imediatamente acondicionadas em arcas frigoríficas e transportadas até ao Laboratório de Bioquímica da Estação Florestal Nacional, onde foram adequadamente congeladas a -70°C até ao momento da extracção do DNA para análise.

Tabela 2.1 – Identificação das parcelas e dos sobreiros.

Local	Parcela	Sobreiros seleccionadas
Herdade Monte Fava	B4	B4/2, B4/10, B4/14, B4/18, B4/22
	B7	B7/1, B7/2, B7/5, B7/7, B7/14
	B9	B9/6, B9/9, B9/13, B9/19, B9/21
	B10	B10/11, B10/12
	B15	B15/6, B15/9
	Árvore isolada	M25
Herdade da Palma	VC2	VC2.14, VC2.15
	VC4	VC4.24, VC4.25
	VC5	VC5.1, VC5.17
Companhia das Lezírias	MPSI.1	MPSI.1.1, MPSI.1.2, MPSI.1.3, MPSI.1.5, MPSI.1.6, MPSI.1.7,
	MMII.1	MMII.1.2, MMII.1.3, MMII.1.5, MMII.1.6, MMII.1.7
	MPNIII.1	MPNIII.1.1, MPNIII.1.2, MPNIII.1.3, MPNIII.1.4, MPNIII.1.5, MPNIII.1.6
Herdade da Espirra	MO5	MO5.5, MO5.7, MO5.10, MO5.15, MO5.16
	MO6	MO6.8, MO6.20, MO6.26, MO6.31
	MR14	MR14.2, MR14.4, MR14.6, MR14.7, MR14.12
	MR14a	MR14a.1, MR14a.2, MR14a.3, MR14a.4, MR14a.5
	PMR42	PMR42.1, PMR42.2, PMR42.4, PMR42.11, PMR42.12
	PMR44	PMR44.4, PMR44.11
	PMR44a	PMR44a.4, PMR44a.14, PMR44a.18, PMR44a.26, PMR44a.28

2.3. Cortiça

As pranchas de cortiça foram extraídas durante os meses de Maio, Junho e Julho a 1,30 m de altura do fuste e na face virada a Norte. Após a extracção, as pranchas de cortiça foram transportadas para o Laboratório de Tecnologia da Cortiça da Estação Florestal Nacional, onde foram acondicionadas à temperatura e humidade ambiente.

2.4. Métodos

2.4.1. Extracção de DNA genómico

A extracção de DNA é a primeira etapa do processo e é de grande importância para a qualidade das informações geradas por análises moleculares.

Para a extracção do DNA foram seguidas as instruções do fornecedor para o protocolo do DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) (Anexo E.I.), alterando apenas o tempo de incubação a 65°C de 5 minutos para 30 minutos. Após a extracção dos ácidos nucleicos, procedeu-se ao tratamento com RNase A na concentração final de 100µg/mL. A mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora.

2.4.2. Determinação da concentração e pureza do DNA

A concentração de DNA inicialmente contido na solução onde se irá efectuar a reacção de polimerização tem influência no resultado da mesma (Micheli *et al.*, 1997). Sendo assim, é necessário conhecer essa concentração no final do processo de extracção de modo a ajustá-la e padronizá-la em todos os ensaios realizados.

A concentração e a pureza do DNA extraído foram quantificadas, recorrendo-se à determinação das absorvâncias a 260nm (A_{260}) e a 280nm (A_{280}) num espectrofotómetro (BioRad Smart-Spec 3000), uma vez que o valor de 1.0 a A_{260} corresponde a 50µg/mL de dsDNA enquanto a razão A_{260}/A_{280} indica o grau de pureza (ausência de proteínas) do dsDNA. As amostras de sobreiro analisadas continham, por um lado, elevadas concentrações de DNA, sendo necessário recorrer a diferentes diluições (com água milliQ estéril) para se obter a concentração final pretendida de 100 ng de DNA/µL e, por outro lado, elevado grau de pureza, dado que as razões A_{260}/A_{280} eram superiores a 1,8 [8].

2.4.3. Amplificação do DNA por PCR

A reacção em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction), ou *PCR*, é uma técnica de grande versatilidade que consiste na amplificação *in vitro* de DNA e permite obter múltiplas cópias de um determinado segmento.

Ao DNA extraído é adicionada uma mistura que contém os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), os *primers* (oligonucleótidos iniciadores) e a enzima Taq DNA polimerase numa solução tampão. Toda esta mistura é colocada no termociclador, que é programado para realizar vários ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exactos. Durante a PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples (desnaturação), seguidamente por abaixamento da temperatura ocorre a ligação dos *primers* (hibridação), oligonucleótidos de cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleótidos, e por último, por elevação da temperatura, realiza-se a extensão do fragmento amplificado. A PCR é um método de análise muito sensível e deve ser realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar os resultados. Por isso, todos os reagentes (conservados a -20°C) e a preparação da mistura de reacção (excepto a adição do DNA) foram manuseados numa câmara previamente esterilizada por exposição a luz ultra-violeta.

O DNA extraído foi amplificado utilizando-se o Kit Taq PCR Master Mix (QIAGEN) (Anexo E.II.) e as reacções de amplificação ocorreram num termociclador PCR Express Hybaid. Os produtos amplificados foram posteriormente submetidos a electroforese em gel de agarose.

2.4.4. Electroforese de DNA em gel de agarose (AGE)

A separação electroforética é o método mais utilizado para avaliar a dimensão molecular de fragmentos de DNA. As amostras são colocadas nos poços de um gel e, devido à aplicação de um campo eléctrico, vão migrar para o pólo positivo (ânodo), uma vez que os ácidos nucleicos, de pH neutro, têm carga negativa. A corrida electroforética é realizada em gel de agarose de 1,5%, 1,0% ou 0,8%, consoante a nitidez/separação/distinção das bandas pretendidas, dado que a agarose funciona como um filtro, em que quanto maior a concentração de agarose mais apertada é a malha do filtro. Deste modo, quanto mais pequenas as moléculas mais rapidamente atravessam os poros do gel de agarose (contrariamente às moléculas de dimensões superiores). A migração de ácidos nucleicos origina bandas, que podem ser visualizadas com auxílio de luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo,

uma substância mutagénica que se intercala nas cadeias de DNA e que exposta a radiação UV emite uma fluorescência alaranjada.

Os produtos PCR obtidos para os diferentes *primers* foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,0% em 0,5x TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,0, e 1 mM EDTA) contendo 0.5 µg/mL de brometo de etídeo e os resultantes perfis electroforéticos foram visualizados no gel, sob luz ultravioleta, no analisador de imagens VersaDoc (Bio-Rad).

2.4.5. Variabilidade genética - Detecção de regiões codificantes de genes PAL

Para a detecção de eventuais polimorfismos nucleotídicos contidos nas regiões codificantes da PAL foram utilizados vários *primers* (Tabela 2.2) seleccionados e desenhados com base na análise de sequências nucleotídicas referidas por vários autores (Dvornyk *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 2002; Cochrane *et al.*, 2004; Mahesh *et al.*, 2006) e registadas na base de dados GenBank [9]. As misturas reaccionais foram preparadas de acordo com a Tabela 2.3 e o programa de PCR utilizado (após optimização) consta da Tabela 2.4.

Tabela 2.2 – Designações e sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados para detectar e promover a amplificação de regiões codificantes de genes PAL em *Quercus suber*. (F) - *primer forward*; (R) - *primer reverse*.

Primers F	Sequência nucleotídica (5'- 3')	Primers R	Sequência nucleotídica (5'- 3')
PAL1	TGG GGG TTA GCT GCT GAG GG	PAL2	AAG AGC ACC ACC ATT CTT GG
PAL3	ATG GAT CAA ATC GAA GCA ATG	PAL4	TTA GCA AAT CGG AAT CGG AGC
PAL5	ATG GAG TTT CGT CAA CCA AAC	PAL6	TTA GCA GAT AGA AAT CGG AGC A
PAL7	ATG GAG CTA TGC CAA TCA AAA C	PAL8	TCA ACA GAT TGA AAC CGG AGC
PAL9	GTY ACT ACT GGT TTT GGT GC	PAL10	GCA TYA ATG GAT AGG TWG CAC T
PAL11	GTC ACT ACT GGT TTT GGT GC	PAL13	GCA TCA ATG GAT AGG TAG CAC T
PAL12	GTT ACT ACT GGT TTT GGT GC	PAL14	GCA TCA ATG GAT AGG TTG CAC T GCA
PAL17	ACA GAC CAC TTG ACA CAT A	PAL15	TTA ATG GAT AGG TAG CAC T
PAL19	ATY GAG GCT GCT GCY ATT ATG	PAL16	GCA TCA ATG GAT AGG TTG CAC T
PAL21	ATT GAG GCA GCA GCT ATA ATG	PAL18	TTT GAA AAT TGA GCA AAC A
		PAL20	ACA TCT TGG TTG TGY TGC TC
		PAL22	ACA TCT TGG TTA TGT TGC TC

Tabela 2.3 – Componentes e respectivos volumes na mistura reaccional para o conjunto de *primers* PAL.

Componente	Volume (μL)	Concentração final
Tampão 2X	12,5	dNTPs – 200 μM cada MgCl ₂ – 1,5 mM Taq DNA polimerase – 2,5 U
MgCl ₂ (50 mM)	2	4 mM
Primer forward (10 μM)	1	0,4 μM
Primer reverse (10 μM)	1	0,4 μM
Água destilada estéril	7,5	-
DNA	1	100 ng

Tabela 2.4 – Programa de PCR utilizado para amplificação do DNA

Etapas	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (minutos)			Número de ciclos
		PAL1 a PAL 8	PAL9 a PAL1 8	PAL21/ PAL22	
Desnaturação inicial	94	3	3	10	1
Desnaturação	94	1,10	0,45	0,30	35
Hibridação	50	1	0,30	0,30	
Extensão	72	2	2	0,30	
Extensão final	72	10	5	10	1

2.4.5.1. Análise dos perfis electroforéticos

Para análise dos resultados obtidos por PCR, recorreu-se a métodos de taxonomia numérica e utilizou-se o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.0 (“Applied Biostatistics Inc”) (Nóbrega, 1996). Assim, a partir da leitura dos géis foi construída uma matriz binária, dispondo em linhas (OTUs) as 73 árvores e em colunas as bandas polimórficas (Anexo D.I), indicando-se a presença de uma banda com 1 e a ausência com 0. Para aquela matriz rectangular e dos vários coeficientes de associação disponíveis para os diferentes tipos de dados, usou-se para o coeficiente de semelhança, para dados qualitativos, o coeficiente de Dice. 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 dendograma.

Para este dendograma 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 dendograma, 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 dendograma 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. 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. 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 (Nóbrega, 1996).

Na Figura 2.5, está representado 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 NTSYSpc (Rohlf, 1992).

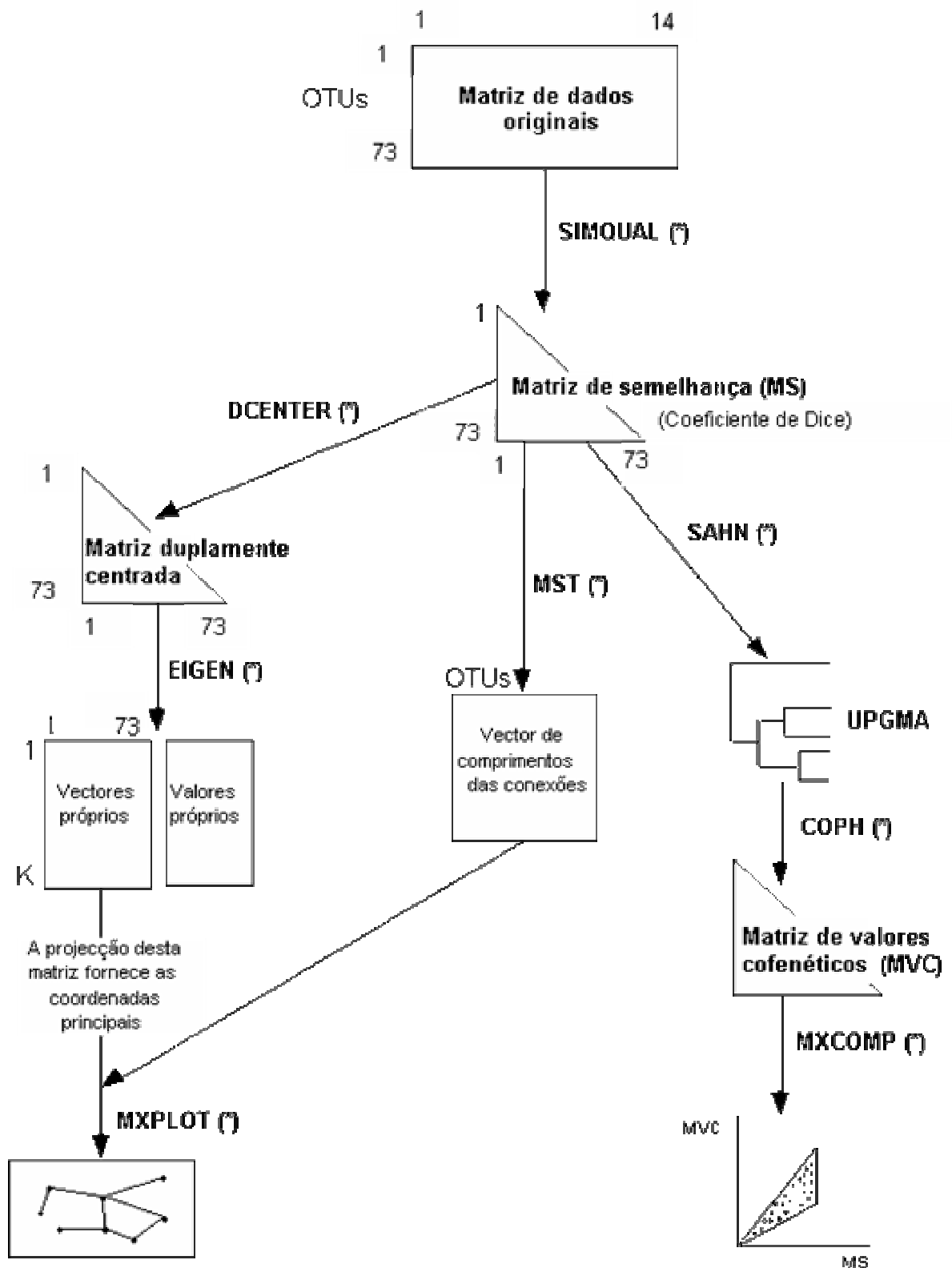


Figura 2.5 – Fluxograma para os dados qualitativos. (*) Programas que operam sobre as matrizes usadas no sistema de programas NTSYSpc (VER. 2.0) (Nóbrega, 1996).

2.4.6. Detecção e identificação de regiões codificantes das proteínas dirigentes

Para amplificação, por PCR, das regiões codificantes de proteínas dirigentes utilizaram-se os *primers* degenerados deduzidos a partir de regiões conservadas de dezoito proteínas dirigentes homólogas de doze espécies de plantas (Xia, 2000), onde B = C/T/G, K = T/G, R = A/G, Y = C/T e W = A/T:

Primer forward - PS6F- 5' KGT GTT YGA YGA YCC YAT TAC YBT WGA CAA C3'

Primer reverse - PS2R - 5'GAA ATA AAC ATC TCC YTC AWA TGM ATC RGT3'.

As reacções de amplificação foram realizadas num termociclador modelo PCR Express Hybaid, num volume total de 25 µL, contendo os componentes referidos na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Componentes e respectivos volumes na mistura reaccional para o conjunto de *primers* das proteínas dirigentes.

Componente	Volume (µL)	Concentração final
Tampão 2X	12,5	dNTPs – 200 µM cada MgCl ₂ – 1,5 mM Taq DNA polimerase – 2,5 U
MgCl ₂ (50 mM)	1	2 mM
Primer forward (10 µM)	0,5	0,2 µM
Primer reverse (10 µM)	0,5	0,2 µM
Água destilada estéril	9,5	-
DNA	1	20-50 ng

O programa de PCR utilizado foi o apresentado na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Programa de PCR utilizado para amplificação com os *primers* PS6F e PS2R.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Número de ciclos
Desnaturação inicial	96	5	1
Desnaturação	96	1	35
Hibridação	48	1	
Extensão	72	1	
Extensão final	72	5	1

2.4.7. Sequenciação

2.4.7.1. Purificação dos produtos PCR

Os produtos amplificados foram purificados utilizando-se o protocolo QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) (Anexo E.III.), a fim de serem eliminados os componentes residuais da reacção, tais como *primers*, nucleotídeos não incorporados, enzima, sais e produtos de PCR inespecíficos. Posteriormente foram sequenciadas as duas cadeias, tendo as reacções de sequenciação sido conduzidas pela empresa STAB Vida.

2.4.8. Amplificação das extremidades 5' e 3' das sequências das proteínas dirigentes

Com base nos resultados obtidos com os *primers* PS6F e PS2R para as duas sequências já registadas no Genbank para a árvore 7/5 (produtora de cortiça de boa qualidade) – número de acesso: DQ023704 “*Quercus suber* dirigent protein Qs7.5 gene, partial sequence” e para a árvore 9/21 (produtora de cortiça de má qualidade) – número de acesso: DQ023705 “*Quercus suber* dirigent protein Qs9.21 gene, partial sequence” (Nóbrega *et al*, 2005), desenharam-se os *primers* apresentados na Tabela 2.7, na tentativa de se conseguir amplificar as extremidades 5' e 3' das proteínas sequenciadas.

Tabela 2.7 – Designação e sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados para a amplificação das extremidades 5' e 3' das sequências das proteínas dirigentes.

<i>Primers</i>	Sequência nucleotídica (5' - 3')
PS6F-R	GTT GTC WAV RGT AAT RGG RTC RTC RAA CAC M
PS2R-R	ACY GAT KCA TWT GAR GGA GAT GTT TAT TTC

As reacções de amplificação foram realizadas, como anteriormente, em termociclador modelo PCR Express Hybaid, num volume total de 25 µL, contendo 1x QIAGEN PCR Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer* e 100 ng de DNA. As reacções PCR foram efectuadas com 35 ciclos de amplificação após uma desnaturação inicial a 96°C durante 5 minutos. Cada ciclo consistiu em 1 min a 96°C, 1 min a 48°C e 1 min a 72°C. Finalmente, procedeu-se a uma extensão final durante 5 min a 72°C.

2.4.9. Polimorfismo de conformação de cadeia simples – SSCP

O DNA de cadeia simples tem tendência para formar estruturas secundárias complexas, estabilizadas por ligações químicas fracas, principalmente por pontes de hidrogénio entre as bases. A técnica SSCP baseia-se nas diferentes velocidades de migração destas estruturas, por efeito da passagem de uma determinada corrente eléctrica, num gel não desnaturante. Esta técnica permite distinguir fragmentos de DNA, com dimensões moleculares entre 150-400 bp, que diferem apenas num nucleótido, o que provoca uma alteração estrutural da molécula e permite identificar SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

Resumidamente, esta técnica consiste na desnaturação dos produtos PCR e aplicação num gel de acrilamida não desnaturante. Posteriormente à passagem de corrente eléctrica, os fragmentos são detectados por coloração do gel com nitrato de prata. O padrão preciso das bandas depende das condições efectuadas.

2.4.9.1. Análise SSCP

O gel utilizado foi o MDE (Mutation Detection Enhancement), preparado com os compostos referidos na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 – Composição do gel MDE.

Componentes	Volume
MDE 2X	2,5 mL
TBE 10X	0,6 mL
H ₂ O	6,36 mL
Glicerol 5%	0,5 mL
TEMED	4 µL
APS 10%	40 µL
Volume final	10 mL

Os produtos PCR foram desnaturados a 100°C durante 8 minutos e colocados imediatamente em gelo, para evitar a renaturação, até aplicação no gel. A 10 µL de amostra adicionou-se igual volume de solução de aplicação de SSCP (Tabela 2.9).

Tabela 2.9 – Composição da solução de aplicação de SSCP.

Reagentes	Concentração
EDTA	20 mM
Azul de Bromofenol	0,05 %
Xilenocianol	0,05 %
Formamida	95 %

A electroforese foi efectuada em tampão 0,6X TBE, e, à temperatura ambiente. Na tina electroforética Protean (Bio-Rad) foi utilizada uma potência de 35W e a electroforese decorreu durante 1 hora. Na tina electroforética Hoefer (Pharmacia Biotech Inc.) usou-se uma potência de 6W e a electroforese decorreu durante 16 horas. A coloração do gel foi realizada de acordo com o protocolo da Tabela 2.10.

Tabela 2.10 – Protocolo de coloração do gel SSCP.

Solução	Tempo (minutos)
Etanol 20%	15
Ácido nítrico 1%	4
H ₂ O	1
Nitrato de prata 0,012M	20
H ₂ O	0,5
Carbonato de sódio 0,28M + 540 µL formaldeído 37%	Até se observarem bandas
Ácido acético 10%	5
H ₂ O	5

2.5. Análise das características físicas da cortiça

Para a realização dos ensaios físicos da cortiça foram determinadas várias características nas pranchas colhidas em 71 sobreiros. Destas pranchas foram retiradas rabanadas, as quais foram sujeitas a ensaios para determinação de parâmetros físicos e de análise de imagem.

2.5.1. Calibre

Nas pranchas de cortiça amadia foi medida a espessura (calibre) (Anexo A.). Para esta característica foram realizadas três medições na prancha, duas nas extremidades e uma no centro, e calculado o valor médio utilizando-se um paquímetro (Anexo G.II.) com incerteza de 0,02 mm. A globalidade das árvores analisadas apresentou valores de calibre dentro da média portuguesa, 32,41mm.

2.5.2. Humidade

Depois do calibre ter sido medido, retiraram-se das pranchas de cortiça crua rabanadas que foram cozidas a 100°C durante duas horas. Após cozedura, as rabanadas foram prensadas e posteriormente colocadas num local arejado durante 48 horas, ao fim do qual se determinou a humidade. Esta operação, além de tornar as rabanadas meias secas, tem por finalidade torná-las planas, o que facilita as determinações seguintes (Pestana da Silva, 2003; Pestana da Silva *et al.*, 2005; Fortes *et al.*, 2004). De seguida, foram colocadas numa estufa a 50°C durante 24 horas para retirar o excesso de água. Posteriormente a esta medição, as rabanadas foram estabilizadas a 20°C. Esta estabilização permite que as rabanadas fiquem suficientemente secas para serem utilizadas no processo seguinte, a análise de imagem. Contudo, esta secagem não deve ser excessiva para que não se verifiquem alterações às dimensões iniciais (Pestana da Silva, 2003; Pestana da Silva *et al.*, 2005).

O teor de humidade foi determinado na massa da cortiça com base no processo descrito na norma NP 2803-2, recorrendo-se ao equipamento Aqua-Boy (Anexo G.II.).

2.5.3. Porosidade

A porosidade foi determinada através da análise de imagem com recurso ao programa VisionPro (COGNEX). Para a análise de imagem, as rabanadas foram seccionadas para a obtenção de provetes com cerca de 10cm X 5cm, utilizando-se uma serra de fita (Anexo G.II). As duas faces dos provetes, a secção tangencial, foram depois preparadas com uma lixa (Anexo G.II) e ar comprimido para regularizar e limpar a superfície e possibilitar a obtenção de uma imagem nítida e com os poros perfeitamente delimitados.

Para a aquisição e análise de imagem foi seguido o procedimento descrito por Fonseca *et al.* (1992) e Fonseca (2000). Esta técnica consiste na determinação pormenorizada de todas as áreas negras, isto é, dos poros, que se diferenciam facilmente da massa de cortiça (áreas de cor clara). O quociente entre as áreas dos poros (máxima, média e mínima) e a área total da amostra, dá a indicação da porosidade, expressa em percentagem. A determinação da porosidade foi realizada no plano tangencial e a imagem foi ampliada quatro vezes, utilizando-se um monitor de alta resolução de um microcomputador.

2.5.4. Densidade

A densidade foi determinada pelo quociente entre a massa do provete (m) e o seu volume ($\pi r^2 H$). A massa foi obtida por pesagem numa balança analítica e o volume do provete cilíndrico foi determinado pela medida da altura e de dois raios da base medidos perpendicularmente um ao outro, com um paquímetro (Anexo G.II).

2.5.5. Ensaio de Torção

Para a realização dos ensaios de torção foram aproveitados os provetes que tinham sido anteriormente utilizados na análise de imagem e que apresentavam um calibre maior ou igual a 25 mm. Estes provetes foram brocados de forma automática no sentido perpendicular aos canais lenticulares, numa máquina "cega" (Anexo G.II), do mesmo modo a que são sujeitas as rabanadas em muitas das empresas rolheiras.

De cada provete foram retiradas três rolhas com aproximadamente 50 mm de altura (Pestana da Silva, 2003). Para a execução do ensaio de torção, recorreu-se à metodologia referida na norma NP 2803-6, usada na caracterização físico-mecânica da rolha cilíndrica de aglomerado composto de cortiça.

Os ensaios de torção foram realizados numa prensa TC 2000 (Anexo G.II) que determina a força máxima de torção e o ângulo de torção correspondente ao binário máximo a que as rolhas estão sujeitas.

2.5.6. Análise dos dados das características físicas da cortiça

Para a realização da análise das características físicas da cortiça (dados quantitativos) recorreu-se também a métodos de taxonomia numérica e utilizou-se o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.0 ("Applied Biostatistics Inc") (Nóbrega, 1996)

Preparou-se previamente a matriz de dados com 71 linhas (OTUs), correspondentes às árvores analisados (18 árvores para a Herdade de Monte Fava, 6 árvores para a Herdade da Palma, 18 árvores para a Companhia das Lezírias e 29 árvores para a Herdade da Espirra) e com 7 colunas relativas às características físicas da cortiça (Anexo D.II). De seguida, fez-se a standardização da matriz original, obtendo-se uma nova matriz de dados standardizados. 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), também se utilizou, tal como para a análise dos dados electroforéticos, o método UPGMA 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 2.4.5.1.

O método de ordenação utilizado para obter uma imagem da distribuição dos pontos representativos das 71 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 a função PROJ que utiliza a matriz de vectores próprios e a de dados standardizados, são calculadas as coordenadas dos OTUs, no novo sistema de eixos principais (Nóbrega, 1996).

Foram ainda feitas as projecções das características físicas da cortiça nas três primeiras componentes principais, o que nos permite analisar a contribuição de cada uma dessas características na disposição espacial das árvores.

A Figura 2.6 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. 2.0) (Rohlf, 1992).

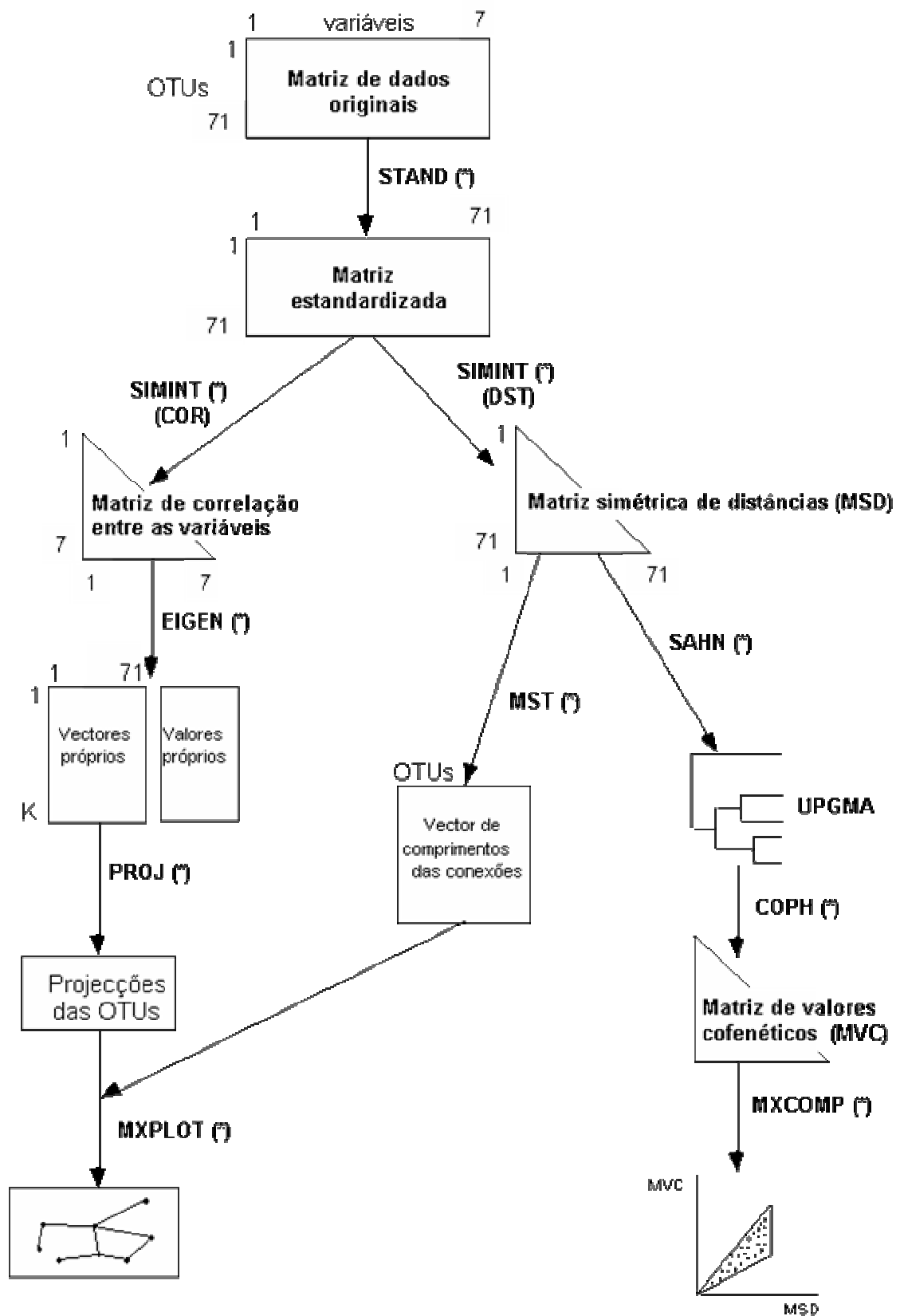


Figura 2.6 – Fluxograma para as características físicas. (*) Programas que operam sobre as matrizes usadas no sistema de programas NTSYSpc (VER. 2.0) (Nóbrega, 1996).

3. Apresentação e Discussão dos Resultados

3.1. Quantificação do DNA total

A análise do DNA extraído de acordo com o protocolo comercial do DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) feita em gel de agarose 0,8% (p/v) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo demonstrou o elevado grau de pureza e a integridade dos DNAs, como se exemplifica para algumas das árvores na Figura 3.1. Adicionalmente, permitiu estimar, aproximadamente, a concentração de DNA nas amostras por comparação com o marcador de concentração (EZ Load Precision Molecular Mass Standard, BioRad). O protocolo utilizado para a extracção apresentou uma eficiência média de 1 µg de DNA/200 mg de folhas frescas.

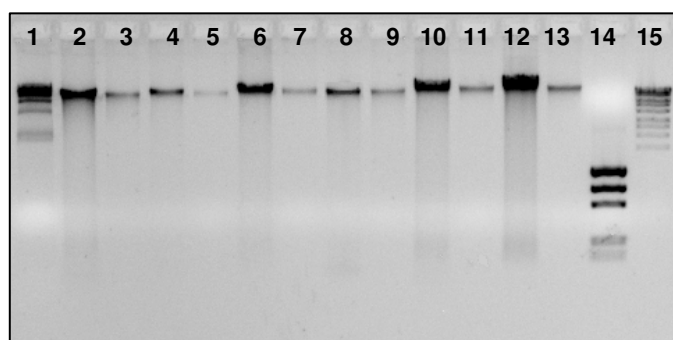


Figura 3.1 – Perfis electroforéticos do DNA extraído com o protocolo DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) em gel de agarose 0,8%, em TBE 0,5x: 1 – Marcador λ DNA/Hind III (GIBCO BRL); 2 a 13 (sobreiro nº) 2 – 7/1 (1ª eluição); 3 – 7/1 (2ª eluição); 4 – 7/2 (1ª eluição); 5 – 7/2 (2ª eluição); 6 – 7/5 (1ª eluição); 7 – 7/5 (2ª eluição); 8 – 7/7 (1ª eluição); 9 – 7/7 (2ª eluição); 10 – 7/14 (1ª eluição); 11 – 7/14 (2ª eluição); 12 – 9/9 (1ª eluição); 13 – 9/9 (2ª eluição); 14 – Marcador EZ Load Precision Molecular Mass Standard (BioRad) (Anexo F); 15 – Marcador MassRuler, DNA Ladder, High Range (Anexo F).

3.2. Variabilidade genética

3.2.1. Amplificação de regiões genómicas codificantes da fenilalanina amónia liase por PCR

Na amplificação das regiões genómicas codificantes da fenilalanina amónia liase (PAL), a enzima-chave do metabolismo de fenilpropanóide que actua na formação dos precursores da lenhina (um dos principais componentes da cortiça), apenas os *primers* PAL1/PAL2 (Tabela 2.3) apresentaram polimorfismo, como se exemplifica na Figura 3.2, e, por isso, foram seleccionados para análise da variabilidade genética entre as diferentes populações.

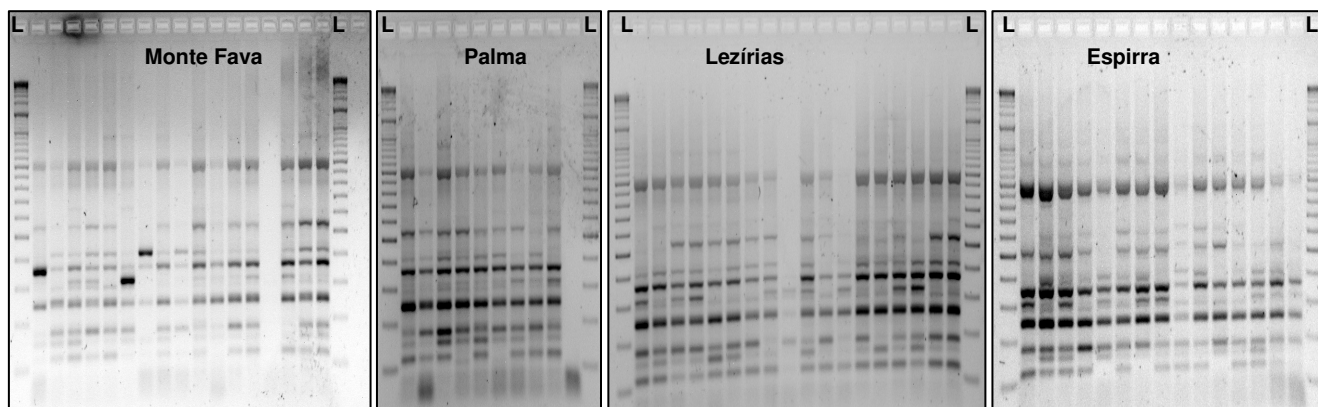


Figura 3.2 – Perfis electroforéticos dos produtos PCR amplificados após 1,5% AGE. L – Marcador 100+500 bp DNA Ladder (O’RangeRuler) (Anexo F); As amostras da Herdades de Monte Fava, Herdade da Palma, Companhia das Lezírias e Herdade da Espirra estão dispostas no gel da agarose de acordo com as Tabela 2.1 a 2.4.

A análise estatística dos perfis electroforéticos obtidos com estes *primers* e recorrendo-se ao programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.0 (“Applied Biostatistics Inc”) permitiu a obtenção do dendograma apresentado na Figura 3.3.

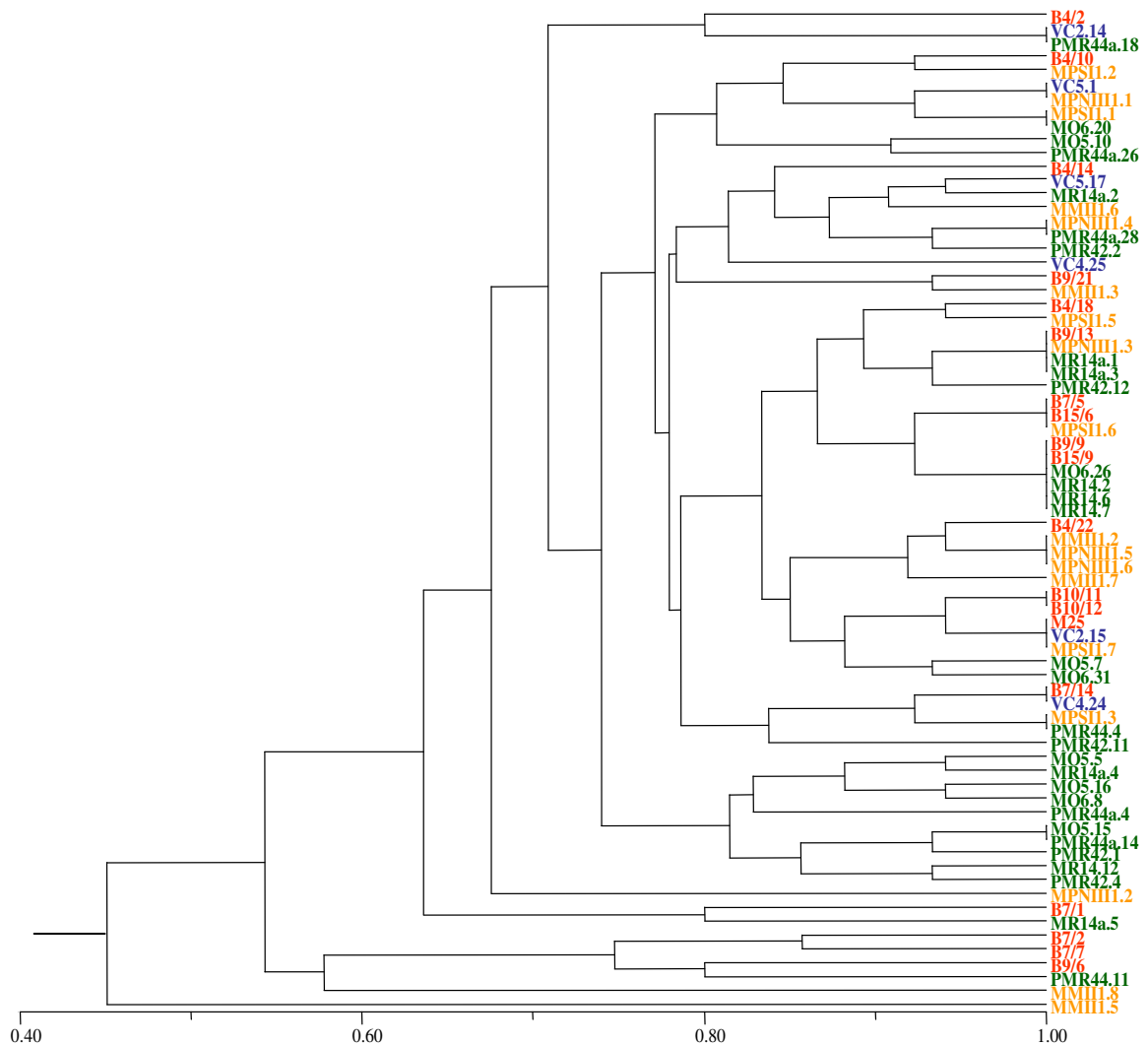


Figura 3.3 – Dendrograma das 73 árvores, baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,799$).

Da análise deste dendrograma, verifica-se que não é possível estabelecer agrupamentos. Considerando a localização dos diferentes sobreiros nas parcelas e estas nas respectivas herdades, verifica-se que as árvores se encontram distribuídas ao longo de todo o dendrograma, ou seja, a distribuição das árvores é independente da sua localização. Por esta análise pode verificar-se que não há uma hierarquia clara que leve à separação dos agrupamentos. Estes resultados parecem demonstrar a grande variabilidade genética existente.

Na Figura 3.4 apresentam-se os resultados da projecção 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 17,91 para a primeira e 14,77 para a segunda, e a percentagem acumulada para as três primeiras coordenadas principais é de 46,20, que se pode considerar um resumo relativamente pobre da informação original.

A sobreposição da árvore de conexão mínima (Figura 3.4) permite também demonstrar a inexistência de agrupamentos, não permitindo, assim, diferenciar as árvores em estudo. Estes resultados confirmam o que foi referido na análise do respectivo dendograma, ou seja, o elevado polimorfismo e a grande variabilidade genética interpopulacional.

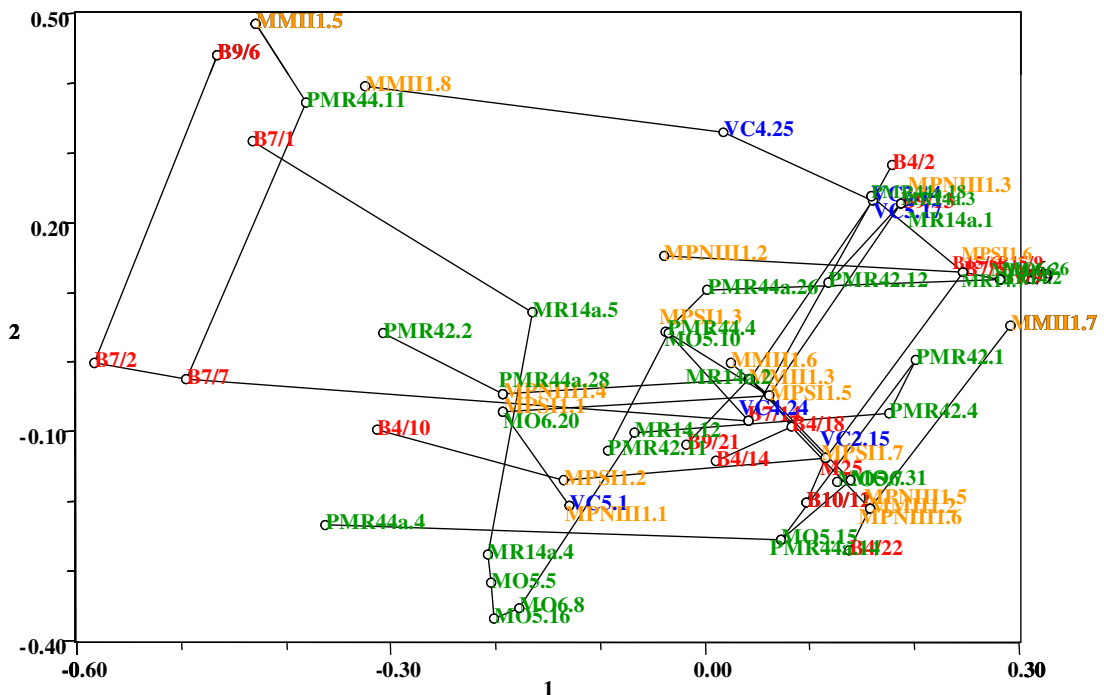


Figura 3.4 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 73 árvores no plano definido pela primeira componente principal (17,91%) e pela segunda componente principal (14,77%) com base nos perfis electroforéticos.

Para analisar a relação entre as árvores em cada herdade, apresenta-se a seguir a análise estatística para cada uma das áreas de estudo.

Herdade do Monte Fava:

Da análise do dendograma apresentado na Figura 3.5, verifica-se que as 19 árvores estudadas podem ser separadas em dois agrupamentos e que o agrupamento 1 pode ainda subdividir-se em quatro subagrupamentos. Verifica-se ainda, que a semelhança média entre as árvores que constituem esta população é de aproximadamente 55%. Pode observar-se também, que árvores da mesma parcela se distribuem por subagrupamentos distintos, como por exemplo, as árvores das parcelas B7 e B15.

A sobreposição da árvore de conexão mínima às projecções das árvores no plano definido pelas primeira e segunda coordenadas principais (Figura 3.6), confirma os resultados anteriores obtidos na análise do dendograma, ou seja, que as árvores estudadas se distribuem claramente por dois agrupamentos.

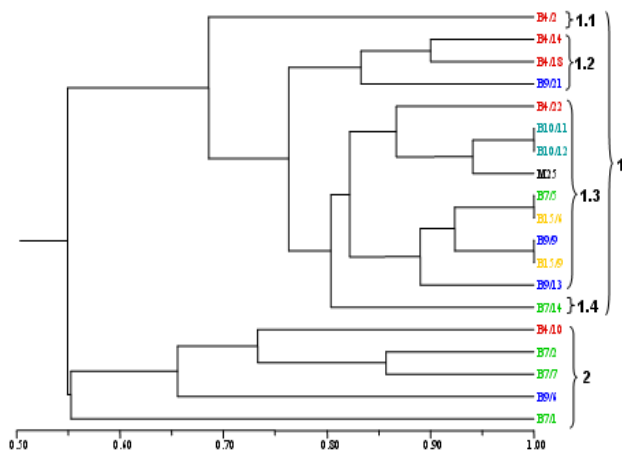


Figura 3.5 – Dendrograma das 19 árvores localizadas na Herdade de Monte Fava (Parcela B4, B7, B9, B10 e B15), baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,829$).

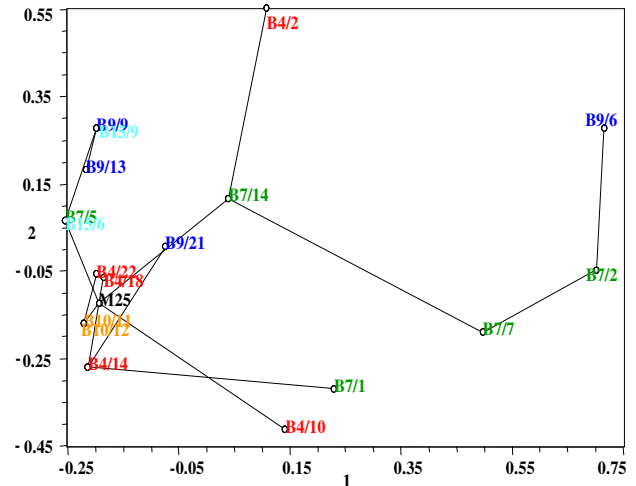


Figura 3.6 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 19 árvores no plano definido pela primeira componente principal (33,02%) e pela segunda componente principal (18,77%) com base nos perfis electroforéticos

Herdade da Palma:

Sendo o objectivo final deste trabalho o estabelecimento de correlações entres os resultados moleculares e os dados morfológicos da cortiça, nesta herdade apenas se podem analisar as 6 árvores que foram descortiçadas.

Tendo em atenção o universo reduzido de amostras analisadas, o dendrograma apresentado na Figura 3.7 permite observar a formação de dois agrupamentos e a semelhança média corresponde aproximadamente a 75%. Na Figura 3.8 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.

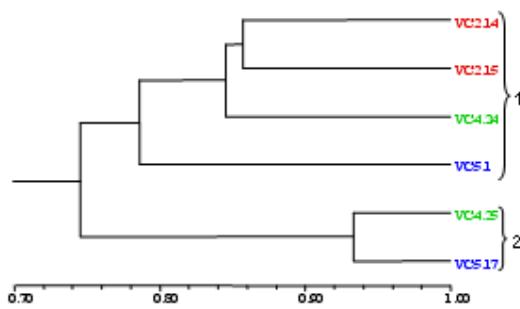


Figura 3.7 – Dendrograma das 6 árvores localizadas na Herdade de Palma (Parcelas VC2, VC4 e VC5), baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,586$).

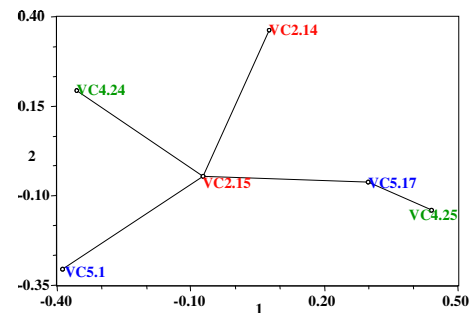


Figura 3.8 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 6 árvores no plano definido pela primeira componente principal (53,55%) e pela segunda componente principal (26,95%) com base nos perfis electroforéticos.

Companhia das Lezírias:

O dendrograma apresentado na Figura 3.9 mostra que as 18 árvores se distribuem por quatro agrupamentos, sendo o agrupamento 1 constituído por quatro subagrupamentos. Os restantes agrupamentos são constituídos por árvores isoladas. A semelhança média é de aproximadamente 43%, e para o agrupamento 1, a semelhança máxima é cerca de 80%, embora as árvores não se agrupem de acordo com a sua localização nas parcelas. Do mesmo modo, a sobreposição da árvore de conexão mínima às projecções das árvores no plano definido pelas primeira e segunda coordenadas principais (Figura 3.10), confirma o anteriormente referido para a análise ao dendrograma, ou seja, que as árvores estudadas se dividem claramente em dois agrupamentos, em que os sobreiros do segundo agrupamento, MMII.1.5, MMII.1.8 e MPNIII.1.2 estão dispersos.

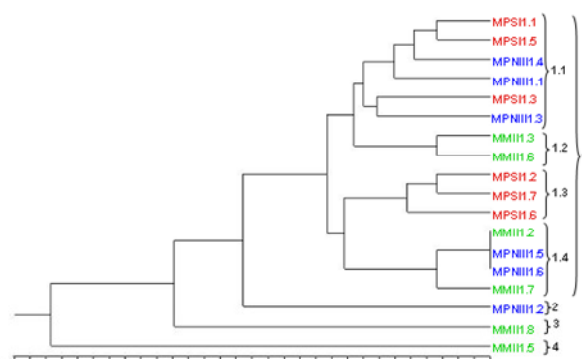


Figura 3.9 – Dendrograma das 18 árvores localizadas na Companhia das Lezírias (MPS – Montado com Pastagem Semeada, MPN – Montado com Pastagem Natural e MM – Montado com Matos), baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,891$).

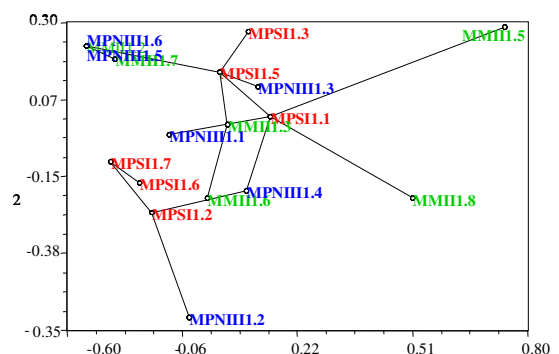


Figura 3.10 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 18 árvores no plano definido pela primeira componente principal (30,70%) e pela segunda componente principal (21,93%) com base nos perfis electroforéticos

Herdade da Espirra:

Pela análise do dendrograma obtido (Figura 3.11) pode verificar-se que as 30 árvores se separam em três agrupamentos. O agrupamento 1 ainda se subdivide em três subagrupamentos e o agrupamento 2 é constituído por seis subagrupamentos. Para esta Herdade a semelhança média é de aproximadamente 59% e a distribuição das árvores pelos diferentes agrupamentos é distinta da sua localização nas parcelas. A confirmação destes resultados é demonstrada pela sobreposição da árvore de conexão mínima às projecções das árvores no plano definido pelas primeira e segunda coordenadas principais (Figura 3.12).

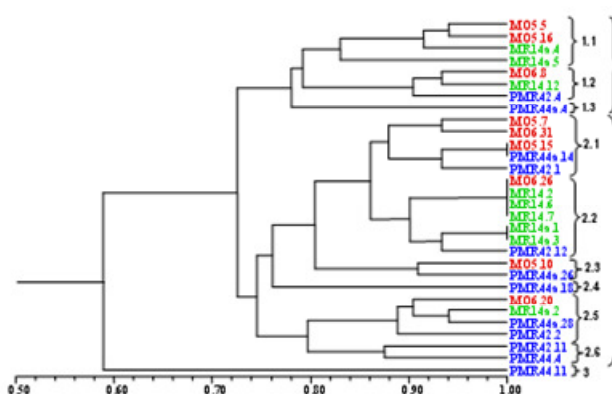


Figura 3.11 – Dendrograma das 30 árvores localizadas na Herdade da Espirra (MO – Montado Ordenados, MR – Montado Regenerado e PMR – Povoamento Misto de Regeneração), baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,750$).

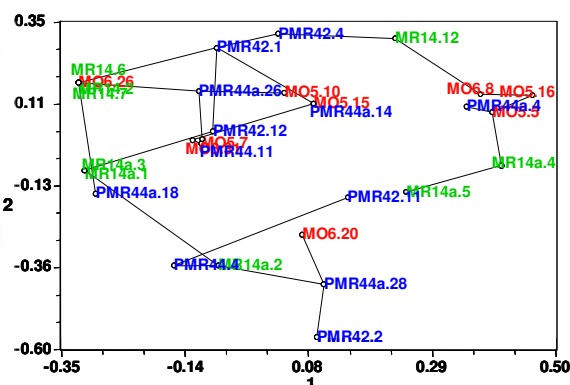


Figura 3.12 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 30 árvores no plano definido pela primeira componente principal (25,22%) e pela segunda componente principal (20,48%) com base nos perfis electroforéticos.

O nível de diversidade genética das várias populações foi também avaliado através da determinação do índice de diversidade de Simpson (D') (Simpson, 1949 e Hunter and Gaston, 1988) e do índice de Shannon (J') (Shannon, 1948), cujos valores apresentados na Tabela 3.1, foram calculados para um intervalo de confiança de 90% (Hunter and Gaston, 1988). Ambos os índices variam entre 0 e 1, e considera-se que quanto mais próximo o valor for de zero mais baixa é a diversidade.

Tabela 3.1 – Índices de diversidade de Simpson (D') e Shannon (J') para a totalidade dos 73 sobreiros e particularizados para cada herdade.

População	D'	J'
Totalidade dos sobreiros	0,960	0,941
Herdade de Monte Fava	0,941	0,938
Herdade da Palma	0,933	0,970
Companhia das Lezírias	0,928	0,936
Herdade da Espirra	0,920	0,958

Como já se tinha verificado pela análise anteriormente realizada, o facto de ambos os índices serem próximos de um vem confirmar o elevado polimorfismo existente nos sobreiros das quatro herdades.

3.3. Sequenciação dos produtos PCR

Em vários projectos de investigação desenvolvidos na Estação Florestal Nacional têm sido estudados em pormenor os sobreiros 7/5 e 9/21 da Herdade do Monte Fava. Por isso, no estudo da PAL realizou-se também a sequenciação de um produto amplificado por PCR obtido com os *primers* PAL21 e PAL22 (Tabela 2.3), para essas mesmas árvores. Seleccionou-se este produto PCR por se ter obtido um perfil electroforético com duas bandas isoladas, tendo uma delas a dimensão molecular esperada de cerca de 500 bp (Figura 3.13).

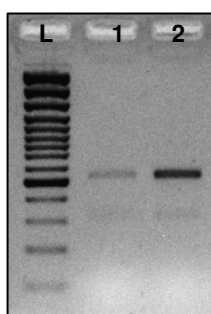


Figura 3.13 – Perfis dos produtos PCR após 1,5% AGE: L- Marcador 100+500 bp DNA Ladder (O'RangeRuler); 1- B7/5 e 2 – B9/21.

Os resultados da sequenciação e a análise das respectivas sequências mostram que a sequência do sobreiro B7/5 difere apenas numa base (A) da sequência do sobreiro B9/21 na sequência complementar à do *primer reverse*.

O alinhamento destas duas sequências com uma sequência PAL de sobreiro registada no Genbank (AY443341) mostra que estas sequências diferem em 7 bases da sequência registada (Figura 3.14).

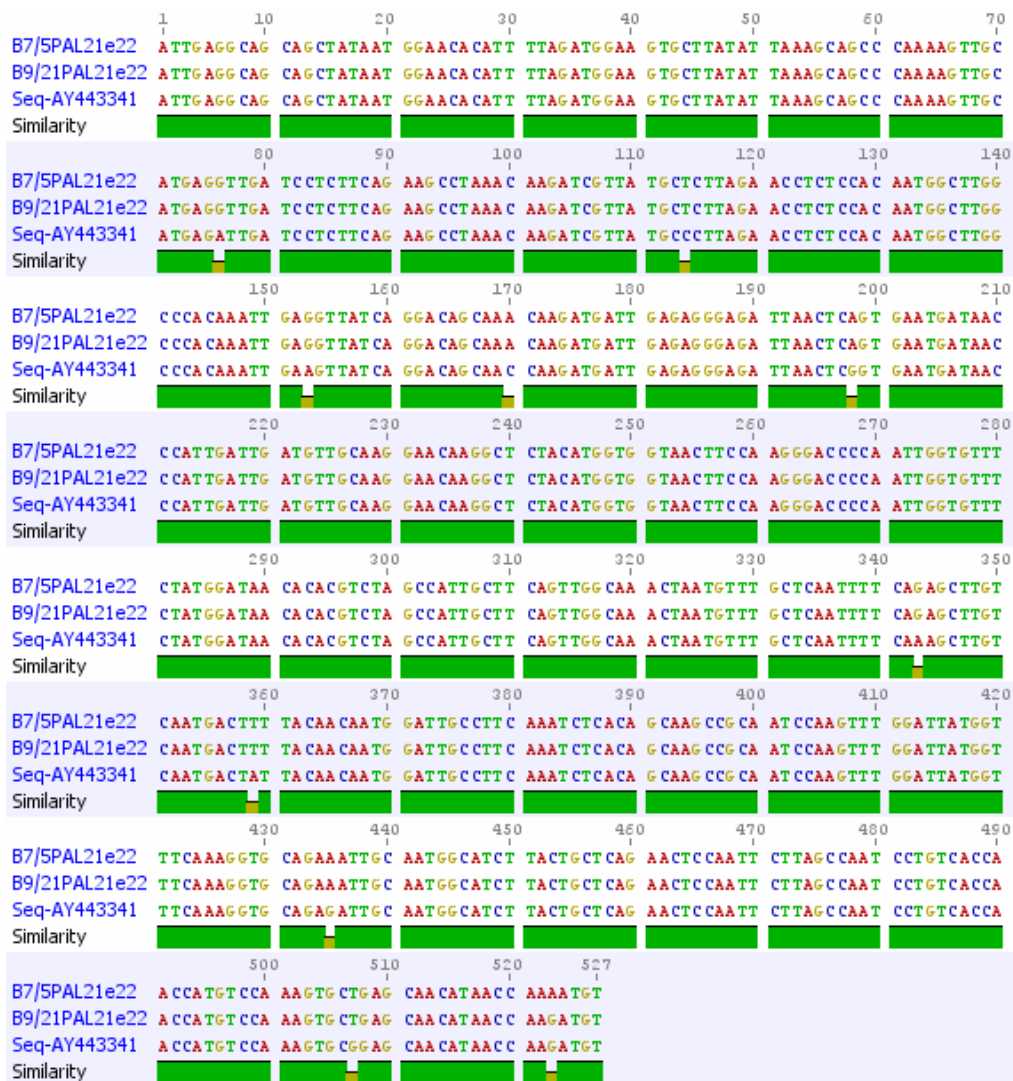


Figura 3.14 - Alinhamento das 3 sequências *forward* com 99% de semelhança, em que para os 527 nucleotídeos de extensão, existem 10 locais polimórficos (Geneious 2.5.2).

3.4. Regiões codificantes de proteínas dirigentes

A descoberta de que proteínas dirigentes estão associadas com células lenhificantes sugere que a formação da lenhina deve estar dependente de severa regulação de proteínas específicas que controlam a formação de ligações individuais. Estas proteínas determinam o teor e o tipo de monómeros fenólicos que devem ser incorporados e o tipo de ligações que devem ser estabelecidas através da orientação e especificidade dos seus locais de ligação.

Assim, prosseguiu-se este trabalho com a detecção e identificação de regiões codificantes de proteínas dirigentes, na tentativa de explicar a divergência fenotípica da qualidade da cortiça. Este estudo apenas foi realizado nos sobreiros localizados na Herdade do Monte Fava.

Da amplificação, por PCR, das regiões codificantes de proteínas dirigentes utilizando-se os *primers* PS6F/PS2R referidos no ponto 2.4.6, resultaram os perfis electroforéticos com um único produto PCR com dimensões moleculares com cerca de 300 bp, como se exemplifica na Figura 3.15. Entre os perfis electroforéticos gerados não foi possível observar qualquer diferença significativa.

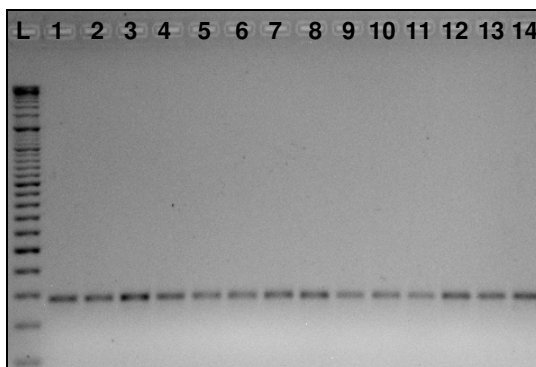


Figura 3.15 – Perfis dos produtos PCR após 1,5% AGE: “lanes” L – 100+500 bp DNA Ladder (O’RangeRuler); 1 a 14 (sobreiro nº) 1- B4/2; 2 - B4/10; 3 - B4/14; 4 - B4/18; 5 - B4/22; 6 - B7/1; 7 - B7/2; 8 - B7/5; 9 - B7/7; B10 - 7/14; 11 - B9/6; 12 - B9/9; 13 - B9/21; 14 – B10/11.

3.4.1. Sequenciação dos produtos PCR

Para verificar se aqueles produtos PCR correspondiam a regiões codificantes de proteínas dirigentes e, se fosse esse o caso, avaliar da ocorrência de qualquer polimorfismo nucleotídico, os fragmentos amplificados, depois de purificados, foram sequenciados pela empresa STAB Vida.

A análise destas sequências com base na informação disponível no GenBank revelou que estes produtos PCR correspondem a sequências parciais de regiões codificantes de proteínas dirigentes.

O alinhamento das sequências *forward* com o reverso complementar das sequências *reverse* originou uma região de sobreposição de 200 a 230 bp para cada amostra. Seguidamente, procedeu-se ao alinhamento de todas as sequências e cada base variável ou duvidosa foi verificada em todos os cromatogramas, garantindo-se assim a fiabilidade nos resultados obtidos.

As sequências foram alinhadas (Figura 3.16) recorrendo-se aos programas BioEdit v. 7.0.5 e Geneious v. 2.5.2.

De seguida, foram analisadas quanto a presença de polimorfismo, ou seja, mutação (alteração de nucleotídeo) e *indels* (delecção/inserção).

O alinhamento destas sequências mostra 97% de semelhança para a região amplificada e mostra também que em 258 nucleotídeos de extensão, há a presença de 13 locais polimórficos.

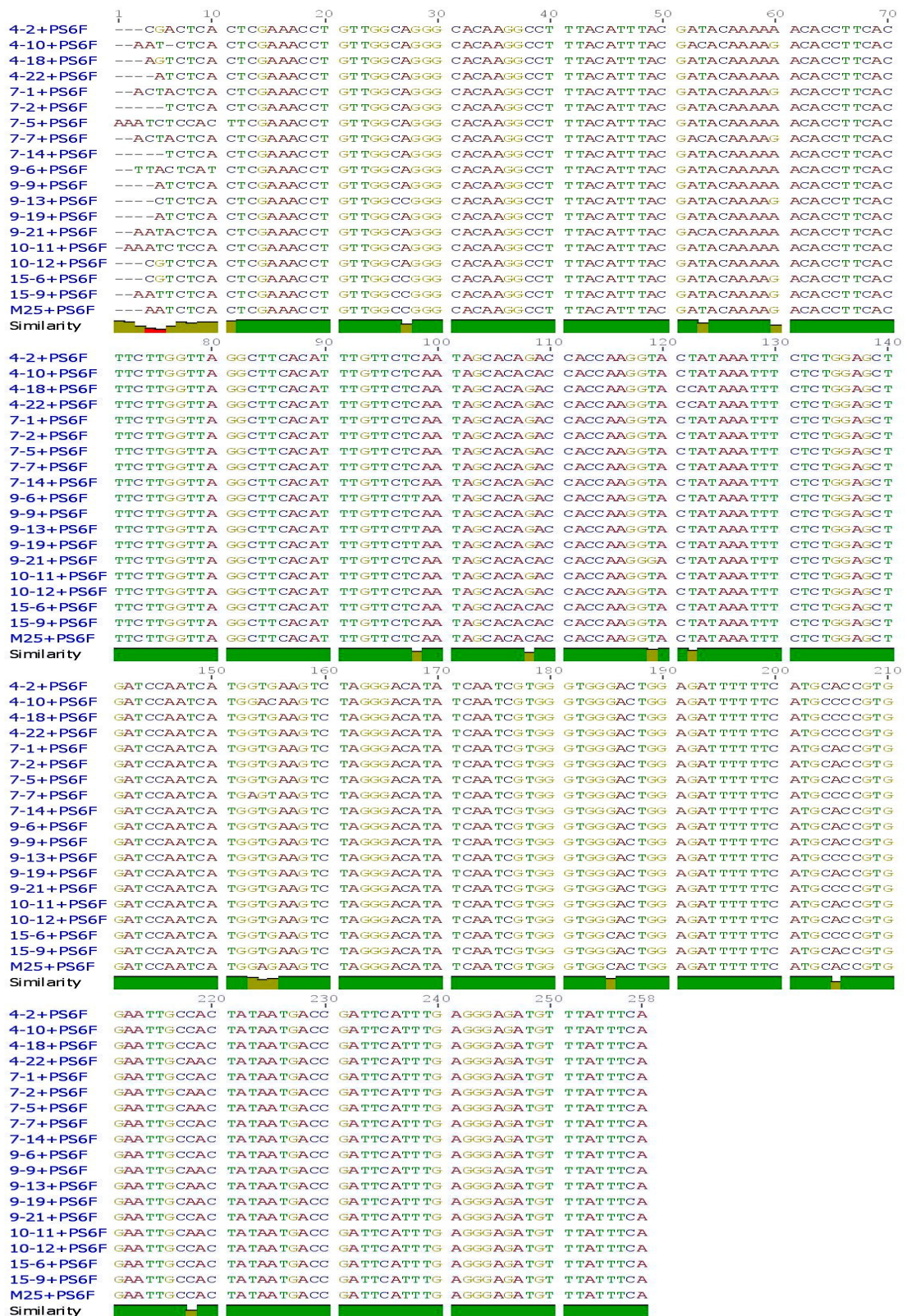


Figura 3.16 - Alinhamento das 19 sequências *forward* com 97% de semelhança, em que para os 258 nucleotídeos de extensão, existem 13 locais polimórficos (Geneious 2.5.2).

3.4.2. Estudo da hidrofobicidade das proteínas dirigentes

Considerando que, muitas vezes, apenas uma única substituição de um aminoácido por outro se pode traduzir numa alteração da conformação e/ou actividade das proteínas, foi realizado o estudo da hidrofobicidade com as respectivas sequências peptídicas (Figura 3.17) pelo método de Kyte & Doolittle (Ward, 2001).

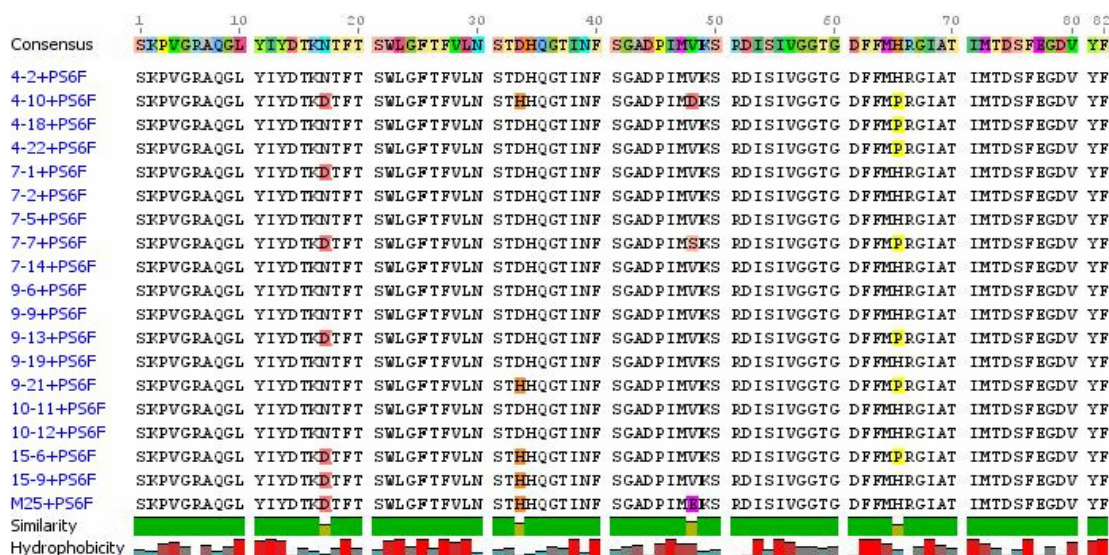


Figura 3.17 – Alinhamento das 19 sequências peptídicas com 98% de semelhança, em que para os 82 aminoácidos, existem 4 locais polimórficos (Geneius 2.5.2).

Na Figura 3.18, apresenta-se o gráfico da hidrofobicidade, obtido com janela de 9 aa, que representa a hidrofobicidade média ao longo das 19 sequências peptídicas.



Figura 3.18 – Gráfico de hidrofobicidade para as 19 sequências peptídicas pelo método de Kyte & Doolittle obtido com janela de 9 aa (Bioedit 7.0).

Pela análise das Figuras 3.17 e 3.18 observam-se diferenças em 4 aminoácidos das sequências peptídicas de algumas amostras, as quais se traduzem numa diferente hidrofobicidade. As diferenças anteriormente referidas, são nos aminoácidos 33, 48 e 65 e ainda no aminoácido 17, esta só foi identificada no alinhamento das sequências peptídicas não sendo a diferença muito preponderante, já que a mesma não se evidencia na Figura 3.18. Para o aminoácido da posição 33, verifica-se que as proteínas das árvores B4/10, B9/21, B15/6, B15/9 e M25 são 3,1% mais hidrófobas que as restantes proteínas, sendo o aminoácido responsável por esta alteração uma histidina (H, índice -3,2 de hidrofobicidade). Na posição 48, existem duas diferenças significativas relativamente à sequência peptídica consenso: *i)* a proteína da árvore B7/7 é 17,5% menos hidrófoba que a proteína consenso, sendo o aminoácido responsável por esta alteração uma serina (S, índice -0,8 de hidrofobicidade); *ii)* as proteínas das árvores B4/10 e M25 são 52,5% menos hidrófobas do que a proteína consenso, sendo os aminoácidos responsáveis por estas alterações o ácido aspártico (D, índice -3,5 de hidrofobicidade) e o ácido glutâmico (E, índice -3,5 de hidrofobicidade). A última diferença verifica-se no aminoácido 65, em que as proteínas das amostras B4/10, B4/18, B4/22, B7/7, B9/13, B9/21 e B15/6 são 42,8% mais hidrófobas que a proteína consenso, sendo responsável por esta alteração o aminoácido prolina (P, índice -1,6 de hidrofobicidade).

3.4.2.1. Estudo das hidrofobicidades das proteínas dirigentes dos sobreiros B7/5 e B9/21

Pelas razões já anteriormente referidas sobre a importância de estudar em pormenor os sobreiros B7/5 e B9/21, analisaram-se isoladamente as sequências peptídicas destes dois sobreiros. Estas sequências peptídicas obtidas a partir das sequências nucleotídicas diferem entre si em 2 aminoácidos, ou seja, são 98% similares (Figura 3.18).

Na figura 3.19 apresentam-se os respectivos gráficos das hidrofobicidades que foram obtidos com janela de 9 aa e representam a hidrofobicidade média ao longo daquelas sequência peptídicas.

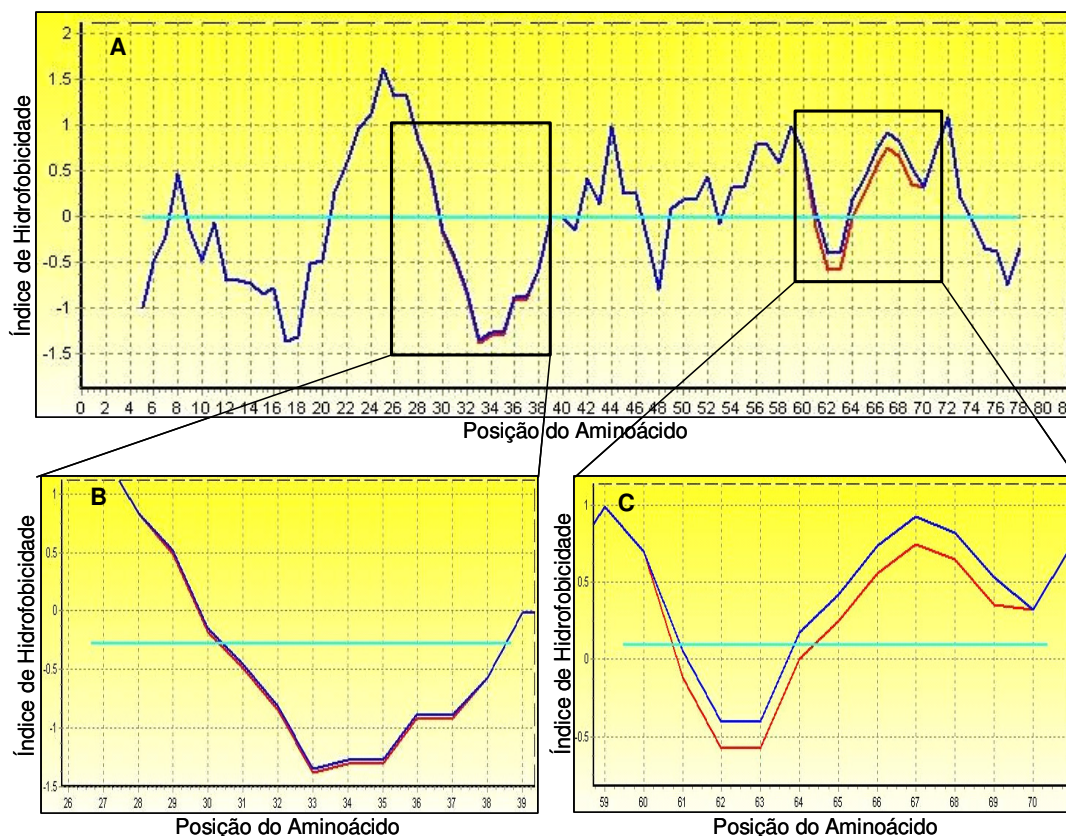


Figura 3.19 – A – Gráfico de hidrofobicidade em função da posição do aa pelo método de Kyte and Doolittle obtido com janela de 9 aa para as proteínas da árvore B7/5 (vermelho) e da árvore B9/21 (azul). **B e C** – Gráficos parciais das hidrofobicidades em função da posição do aa compreendidas entre os aminoácidos 25 e 39 e entre os aminoácidos 59 e 71 para as proteínas B7/5 (vermelho) e 9/21 (azul), respectivamente.

Pela análise do gráfico A da Figura 3.19 verifica-se que a proteína da árvore B7/5 é cerca de 2,1% mais hidrófoba do que a proteína da árvore B9/21, ou seja, esta é mais hidrofílica do que aquela. Isto parece corresponder ao facto da proteína da árvore B7/5 ocorrer num sobreiro produtor de cortiça de boa qualidade enquanto a proteína da árvore B9/21 é sintetizada num sobreiro produtor de cortiça de má qualidade. Por outro lado, embora ambos os perfis de hidrofobicidade sejam típicos de proteínas globulares (isto é, não transmembranares), pela análise mais detalhada dos mesmos (gráfico B e C da Figura 3.18), torna-se evidente que o aminoácido mais responsável pela alteração das hidrofobicidades destas sequências peptídicas é o que reside na posição 33, onde, na proteína da árvore B7/5, ocorre um ácido aspártico (D; índice - 3,5 de hidrofobicidade) enquanto na proteína da árvore B9/21 existe uma histidina (H; índice -3,2 de hidrofobicidade) e na posição 65, onde, na proteína da árvore B7/5, ocorre uma histidina (H; índice -3,2 de hidrofobicidade) enquanto na proteína da árvore B9/21 existe uma prolina (P; índice -1,6 de hidrofobicidade).

Daqui resulta que, na região proteica onde ocorrem estes aminoácidos (posição 65), o índice da hidrofobicidade da proteína B7/5 é cerca de 0,2 enquanto o

da proteína B9/21 é cerca de 0,4. Isto significa que a proteína B9/21 é mais hidrofílica do que a proteína B7/5, ou seja, a B7/5 possui maior afinidade para compostos lipofílicos tal como é o caso dos monolinóis e, portanto, é susceptível de actuar mais activamente na síntese da lenhina e/ou da suberina do que a B9/21.

3.4.3. Análise do polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP)

Pela análise do alinhamento das sequências observou-se um baixo polimorfismo, ou seja, um número reduzido de variações nucleotídicas. Tentou-se, por isso, utilizando os produtos PCR das regiões codificantes das proteínas dirigentes, identificar essas variações através da detecção de alterações nas conformações das cadeias simples de DNA, como se exemplifica na Figura 3.20.

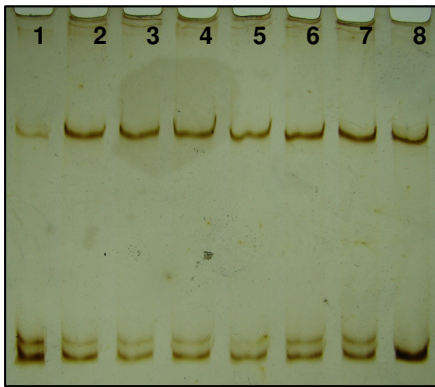


Figura 3.20 – Perfis dos produtos de PCR-SSCP em gel de MDE: 1 a 8 (sobreiro nº) 1- B4/2; 2 - B4/10; 3 - B4/14; 4 - B4/18; 5 - B4/22; 6 - B7/1; 7 - B7/2; 8 - B7/5.

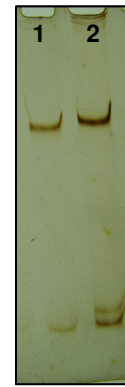


Figura 3.21 – Perfis dos produtos de PCR-SSCP em gel de MDE: 1 – B7/5; 2 – B9/21.

Pela análise dos perfis electroforéticos obtidos não se detectaram alterações significativas de conformação.

No entanto, observa-se nos sobreiros B7/5 e B9/21 (Figura 3.21) um *shift*.

3.5. Descrição das características físicas da cortiça

Dos 73 sobreiros inicialmente seleccionadas para o estudo molecular não foi possível obter amostras de cortiça para 2 árvores por não ser o ano de descortiçamento, sendo que o nosso universo de amostras foi reduzido para 71 árvores.

Na tentativa de relacionar as características físicas da cortiça com os resultados obtidos na análise molecular para os sobreiros das 4 herdades em estudo, utilizaram-se sete características físicas da cortiça, referidas na Tabela 3.2, com os respectivos códigos que foram utilizados. No Anexo B está uma explicação sucinta da determinação sequencial das características físicas da cortiça.

Tabela 3.2 – Características físicas da cortiça.

Característica	Código
Calibre	CAL
Densidade	DEN
Força de Torção	FOR
Ângulo de Torção	ANG
Porosidade	POR
Número de Poros por cm ²	NP/cm ²
Humidade	HUM

Calibre:

Relativamente ao calibre, segundo a Norma NP298 (ISO/DIS 1216), as pranchas de cortiça são classificadas de acordo com a Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Classes de calibre das pranchas de cortiça e seus principais produtos (Fortes *et al.*, 2004).

Designação	Limite de espessura (mm)	Principais produtos
Delgadinha	9 – 22	Discos
Delgada	22 – 27	Discos
Meia-marca	27 – 32	Rolhas
Marca	32 – 40	Rolhas
Grossa	40 – 54	Rolhas
Triângulo	> 54	Granulados

Para a indústria, nomeadamente para o fabrico de rolhas, o calibre é uma característica essencial. Por isso, consideram-se pranchas com um bom calibre

aquelas que podem ser submetidas a um processo de brocagem, em quantidade e qualidade, para a obtenção de rolhas.

Densidade:

A densidade é uma característica de importância prática para a função da cortiça como vedante uma vez que determina directamente a elasticidade da rolha. Segundo Fortes *et al.* (2004), para cortiça amadia cozida, considerada de boa qualidade, os valores de densidade situam-se entre 200 e 250 kg/m³. De acordo com a Norma NP-2803, pode ainda considerar-se cortiça de boa qualidade, quando os valores de densidade são a média da totalidade da densidade das rolhas analisadas.

Ensaio de Torção:

Num ensaio de torção de uma rolha de boa qualidade os valores de força de torção aceitáveis são valores compreendidos entre 0,90 e 1,20 daN (Pestana da Silva, M., 2003). Do grupo de rolhas que apresentam valores fora dos limites referidos, ainda se consideram rolhas com uma qualidade razoável, para aquelas que apresentarem valores acima do limite superior do referido intervalo de força de torção.

Relativamente ao ângulo de torção, as rolhas classificam-se como muito boas para valores superiores a 50º, boas para valores entre 40º e 50º e menos boas para valores inferiores a 40º (Fortes *et al.*, 2004, Pestana da Silva, M., 2003).

Porosidade:

Segundo Fortes *et al.* (2004) e Pestana da Silva, M. (2003) a cortiça apresenta três classes distintas de porosidade como se apresenta na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Diferenciação da porosidade das pranchas de cortiça e sua respectiva qualidade

Designação	Limite de porosidade	Classe de Qualidade
Pouco Porosa	<2%	Boa
Mediana	2 - 4%	Razoável
Muito Porosa	>4%	Má

A análise do número de poros por cm² está directamente relacionada com a porosidade. O principal objectivo desta análise é esclarecer certas dúvidas que possam surgir para determinadas amostras de cortiça.

Humidade:

Relativamente à humidade, uma prancha de cortiça é tanto melhor quanto menor for a sua expansão após ser cozida, ou seja, quanto menor for a retenção de água após o processo de cozedura. Em relação a este parâmetro, o valor de percentagem abaixo do qual se começa a considerar que a prancha de cortiça tem uma absorção de água adequada à produção do seu principal produto, a rolha, é 6% (6g de água por 100g de cortiça seca) (Fortes *et al.*, 2004 e Pestana da Silva, M., 2003).

3.5.1. Herdade Monte Fava

Na Herdade Monte Fava, foram estudadas 17 árvores localizadas em 5 parcelas e uma árvore isolada.

Na Tabela 3.5 apresentam-se os valores de calibre ordenados por ordem decrescente e as respectivas designações.

Tabela 3.5 – Valores de calibre agrupados de modo decrescente segundo as suas designações.

Amostras	Calibre	Designação	Amostras	Calibre	Designação
B15/6	40,00	Marca	B7/1	26,98	Meia-marca
B7/14	39,53		B7/7	26,04	
B10/12	39,00		B4/2	26,00	
B4/22	32,00	Meia-marca	B4/18	26,00	Delgada
B4/14	31,40		B7/5	25,92	
B9/13	31,15		B9/6	25,38	
B10/11	30,00		B9/9	23,00	
B15/9	30,00		B9/21	19,00	Delgadinha
M25	29,54		B4/10	17,00	

De acordo com a Tabela 3.5 as pranchas de cortiça designadas delgada e delgadinha não têm espessura suficiente para o processo de brocagem. No entanto, e porque as pranchas não são regulares, em três amostras da classe delgada, B7/7, B7/5 e B9/6, foi possível obter rolhas a fim de se poder prosseguir com os ensaios de torção e medição de densidade.

Relativamente à densidade, apresentam-se na Figura 3.22 os resultados obtidos por ordem decrescente.

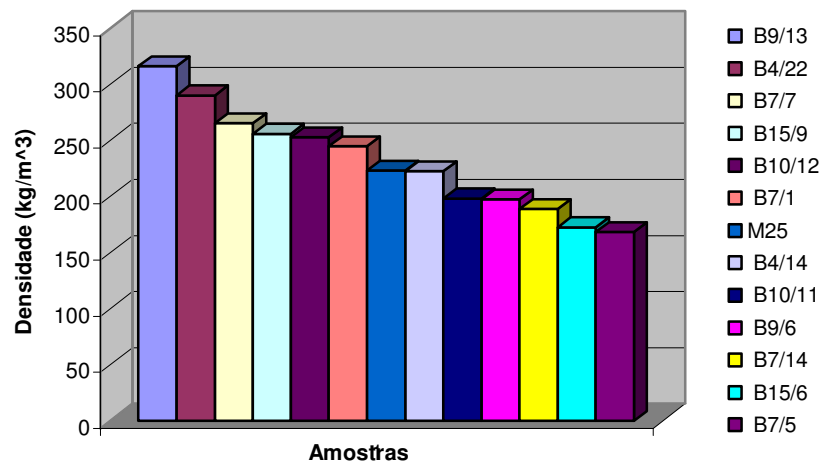


Figura 3.22 – Representação gráfica das amostras da Herdade Monte Fava em função da densidade

De acordo com os limites estabelecidos para este parâmetro, já anteriormente referidos, consideram-se pranchas de cortiça de boa qualidade as correspondentes aos sobreiros B15/9, B10/12, B7/1, M25, B4/14, B10/11 e B9/6.

Quanto à força de torção e observando a Figura 3.23, pode concluir-se que as rolhas que apresentam bons valores de força de torção, igualmente ordenados por ordem decrescente, são as correspondentes às pranchas dos sobreiros B7/14, B10/11, M25, B7/1, B4/14, B9/13 e B9/6.

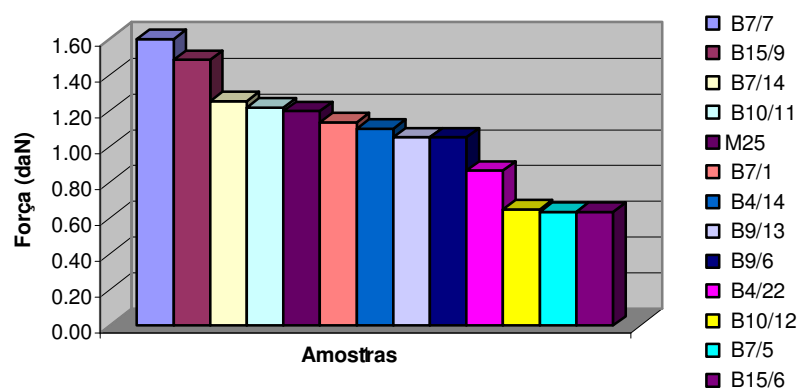


Figura 3.23 – Representação gráfica das amostras da Herdade Monte Fava em função da força de torção.

Para o ângulo de torção apresentado na Figura 3.24, e ordenando de modo decrescente, no grupo das rolhas consideradas muito boas incluem-se os sobreiros B7/7, B7/1, B9/13 e B10/11, no grupo das rolhas consideradas boas estão os sobreiros M25, B7/14, B4/14, B9/6 e B7/5 e os sobreiros restantes agrupam-se nas menos boas.

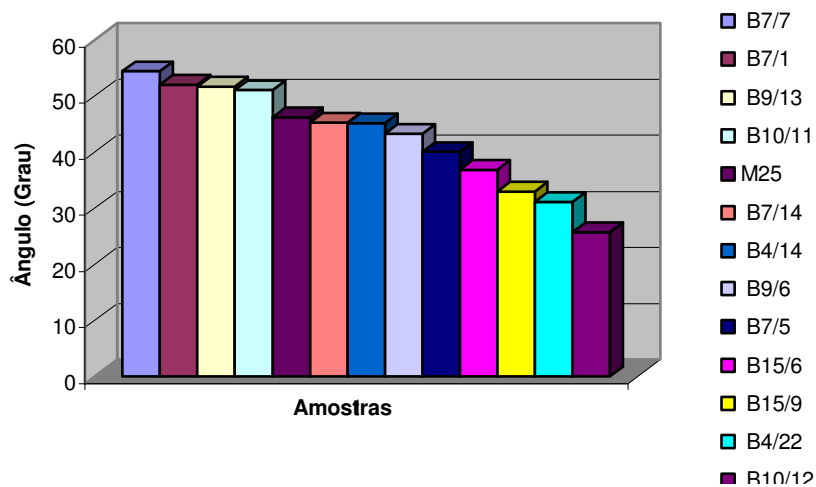


Figura 3.24 – Representação gráfica das amostras do Herdade Monte Fava em função do ângulo de torção.

De acordo com as classes de qualidade definidas com base na porosidade (Tabela 3.4) os provetes analisados distribuem-se conforme se apresenta na Tabela 3.6. Na mesma Tabela, apresentam-se também os valores obtidos para o número de poros por cm^2 .

Tabela 3.6 – Valores de porosidade agrupados de modo decrescente segundo as suas designações e respectivos valores de número de poros por cm².

Amostras	Por	Designação	NP/cm ²	Amostras	Por	Designação	NP/cm ²
B9/6	12,48		4.80	B9/9	3,38		2.77
B4/2	9,70		2.93	B15/9	3,09		3.22
B10/12	5,47	Muito Porosa	5.22	B9/13	2,99	Mediana	3.25
B4/14	5,32		6.79	B9/21	2,83		3.61
B4/18	4,66		3.28	B4/10	2,48		2.38
B4/22	4,11		4.70	M25	1,97		2.99
B15/6	4,04		2.99	B7/7	1,05	Pouco Porosa	1.48
B10/11	3,95	Mediana	3.03	B7/5	0,68		1.13
B7/14	3,70		3.51	B7/1	0,67		1.22

Com base nos valores obtidos para os diferentes parâmetros analisados, apresenta-se na Tabela 3.7 a distribuição das árvores pelas classes de qualidade.

Tabela 3.7 – Distribuição dos sobreiros da Herdade de Monte Fava segundo três classes de qualidade.

Características morfológicas	Classes de qualidade		
	Boa	Média	Má
Calibre	B15/6, B7/14, B10/12, B4/22, B4/14, B9/13, B10/11, B15/9, M25, B7/1, B7/7, B7/5, B9/6,	—	B4/2, B4/18, B9/9, B9/21, B4/10
Densidade	B15/9, B10/12, B7/1, M25, B4/14, B10/11, B9/6, B7/14, B15/6, B7/5	—	B9/13, B4/22, B7/7
Força de torção	B7/14, B10/11, M25, B7/1, B4/14, B9/13, B9/6	B7/7, B15/9	B4/22, B10/12, B7/5, B15/6
Ângulo de torção	B7/7, B7/1, B9/13, B10/11	M25, B7/14, B4/14, B9/6, B7/5	B15/6, B15/9, B4/22, B10/12
Porosidade	B7/1, B7/5, B7/7; M25	B4/10, B9/21, B9/13, B15/9, B9/9, B7/14, B10/11	B15/6, B4/22, B4/18, B4/14, B10/12, B4/2, B9/6

Na análise desta distribuição considerou-se em primeiro lugar a porosidade, uma vez que é a primeira característica observada como indicação de que processamento deve ser seguido, isto é, a obtenção de rolhas, ou discos ou granulado. Em segundo lugar, para as pranchas de boa ou média porosidade, observou-se o calibre, uma vez que este parâmetro determina a obtenção de rolhas ou

discos. Pelo atrás referido, consideraram-se como árvores produtoras de boa cortiça os sobreiros B7/1, B7/5, B7/7, B7/14, B9/13, B10/11, B15/9 e M25.

Para este grupo de sobreiros e relacionando agora as restantes características, devem ser excluídas as árvores B7/5, B7/7 e B15/9, embora as árvores B7/5 e B7/7 tenham uma baixa porosidade, como comprovado pelo número reduzido de poros. Para a árvore B7/5 esses poros apresentam uma área de poro elevada, o que se traduz numa baixa força de torção, factor que é responsável pela sua exclusão.

3.5.2. Herdade de Palma

Na Herdade de Palma foi analisado um número reduzido de sobreiros, VC2.14, VC2.15, VC4.24, VC4.25, VC5.1 e VC5.17, por serem os únicos que estavam no ano de descortiçamento.

Em relação ao calibre, todas as pranchas tinham uma espessura que permitiu a brocagem de rolhas. Segundo a Tabela 3.8, os sobreiros VC2.14, VC2.15 e VC4.24 incluem-se na classe designada por marca por terem uma espessura entre 32 e 40 mm, enquanto os sobreiros VC4.25, VC5.1 e VC5.17, com uma espessura entre 40 e 54 mm, foram classificados na classe designada de grossa.

Tabela 3.8 – Valores de calibre agrupados de modo decrescente segundo as suas designações.

Amostras	Calibre (mm)	Designação
VC5.1	45,57	Grossa
VC5.17	45,10	
VC4.25	42,13	
VC2.15	37,00	Marca
VC2.14	32,47	
VC4.24	32,00	

Relativamente à densidade, e considerando os valores limite tal como já foi referido, as rolhas que apresentam boa densidade pertencem, por ordem decrescente, aos sobreiros VC4.24, VC4.25, VC2.15 e VC5.17 (Figura 3.25).

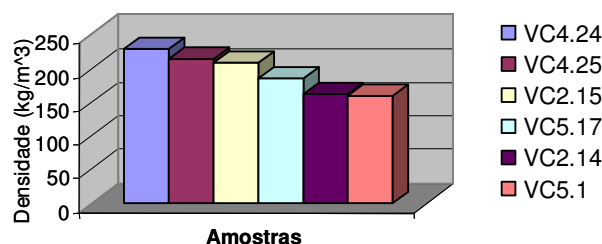


Figura 3.25 – Representação gráfica das amostras da Herdade da Palma em função da densidade.

Para os ensaios de torção, as rolhas que apresentam bons valores de força de torção, pertencem, por ordem decrescente, aos sobreiros VC5.1, VC2.14 e VC4.24 (Figura 3.26). Em relação ao ângulo de torção, os sobreiros VC2.14 e VC2.15 apresentam um valor dentro dos limites, como se pode verificar pela Figura 3.27.

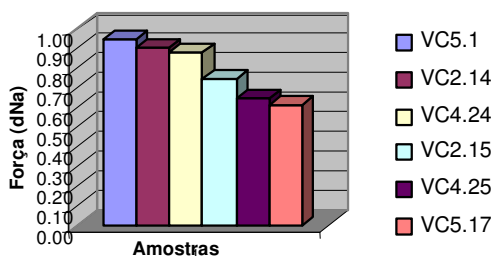


Figura 3.26 – Representação gráfica das amostras da Herdade de Palma em função da força de torção.

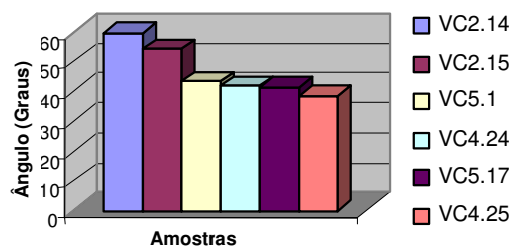


Figura 3.27 – Representação gráfica das amostras do Herdade de Palma em função do ângulo de torção.

Da análise dos ensaios de torção pode concluir-se que a cortiça que apresenta melhores características é a do sobreiro VC2.14, podendo a cortiça do sobreiro VC5.1, com um bom valor de força e um valor de ângulo próximo do patamar inferior (40°), ser considerada de qualidade bastante aceitável.

A análise da porosidade e os respectivos valores obtidos para o número de poros por cm² (Tabela 3.9) vêm confirmar o que foi anteriormente referido para os ensaios de torção e de densidade, ou seja, que o sobreiro VC5.1 é produtor de cortiça de boa qualidade, com um valor de porosidade de 1,51%. Como este valor se traduz numa porosidade inferior a 2%, significa que a prancha de cortiça da amostra VC5.1 analisada é pouco porosa. A amostra VC2.15 apresentou uma porosidade de 3,30%, à qual corresponde uma porosidade mediana (prancha de cortiça com uma qualidade razoável).

Tabela 3.9 – Valores de porosidade agrupados de modo decrescente segundo as suas designações e respectivos valores do número de poros por cm².

Amostras	Porosidade (%)	Designação	NP/cm²
VC4.24	8,02		4,96
VC4.25	7,99	Muito Porosa	5,99
VC5.17	7,04		3,99
VC2.14	4,84		4,25
VC2.15	3,30	Mediana	4,09
VC5.1	1,51	Pouco Porosa	2,80

Relativamente à análise da humidade, todas as amostras com excepção da VC5.17 apresentaram uma humidade inferior a 6%.

A análise de todos os parâmetros para as amostras colhidas nos sobreiros localizados na Herdade de Palma permite concluir que a árvore VC5.1 pode ser considerada o sobreiro produtor de cortiça de melhor qualidade. Dos restantes sobreiros, os que apresentam uma cortiça com qualidade razoável são o VC2.14 e o VC2.15.

3.5.3. Companhia das Lezírias

Na Companhia das Lezírias, foram estudados 18 sobreiros localizados em 3 parcelas.

Na análise do calibre obtiveram-se quatro grupos como se pode verificar pela Tabela 3.10. No grupo com a espessura da cortiça entre 32 e 40 mm, designado de marca, fazem parte os sobreiros MMII.1.6, MPSI.1.6, MMII.1.8 e MPSI.1.1. No grupo designado por meia-marca fazem parte os sobreiros MPSI.1.5, MMII.1.7, MMII.1.2 e MPSI.1.7. Para a amostra MMII.1.2, apesar de aparentemente ter uma espessura apropriada para o processo de brocagem, não foi possível obter rolhas devido à grande quantidade de defeitos.

As pranchas de cortiça pertencentes às classes delgada e delgadinha não têm espessura suficiente para serem submetidas ao processo de brocagem. Para não reduzir demasiado o universo das amostras tentou-se, ainda que com calibre insuficiente, obter rolhas, o que foi possível no sobreiro MPSI.1.3 Assim, foram brocadas oito rolhas da totalidade de pranchas cozidas.

Tabela 3.10 – Valores de calibre agrupados de modo decrescente segundo as suas designações.

Amostras	Calibre	Designação	Amostras	Calibre	Designação
MMII.1.6	37.42	Marca	MPNIII.1.4	26.32	Delgada
MPSI.1.6	36.96		MMII.1.3	26.24	
MMII.1.8	36.58		MPSI.1.3	26.10	
MPSI.1.1	34.07	Meia-marca	MPNIII.1.3	24.94	Delgadinha
MPSI.1.5	31.50		MPNIII.1.5	24.32	
MMII.1.7	31.10		MPNIII.1.1	24.15	
MMII.1.2	27.27		MPNIII.1.6	23.29	
MPSI.1.7	27.04	Delgada	MMII.1.5	21.89	Delgadinha
MPSI.1.2	26.56		MPNIII.1.2	16.79	

Da análise da Figura 3.28 para a densidade, e com base na informação referida anteriormente, obtendo-se para a média o valor de 170 kg/m³, as amostras, ordenadas por ordem decrescente, que se consideram como cortiças de boa qualidade correspondem aos sobreiros MPSI.1.3, MPSI.1.6, MPSI.1.7, MMII.1.6 e MMII.1.8.

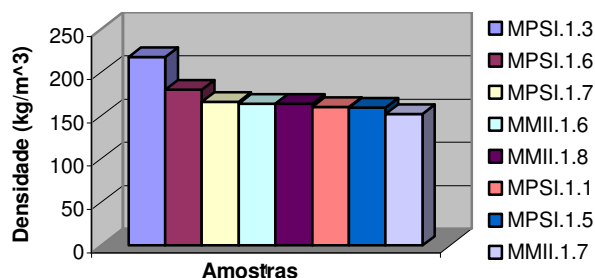


Figura 3.28 – Representação gráfica das amostras da Companhia das Lezírias em função da densidade.

Relativamente aos dados resultantes dos ensaios de torção, pode concluir-se que as rolhas que apresentam uma força suficientemente alta são as correspondentes aos sobreiros MPSI.1.1, MMII.1.6 e MPSI.1.3, como se apresenta na Figura 3.29. No caso do ângulo de torção (Figura 3.30) as amostras MPSI.1.5, MPSI.1.3 e MPSI.1.1 distinguem-se por ter valores muito bons e as amostras MPSI.1.6, MMII.1.7 e MPSI.1.7 são classificadas como tendo um bom ângulo de torção.

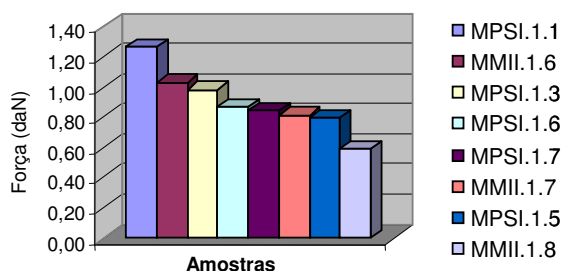


Figura 3.29 – Representação gráfica das amostras da Companhia das Lezírias em função da força de torção.

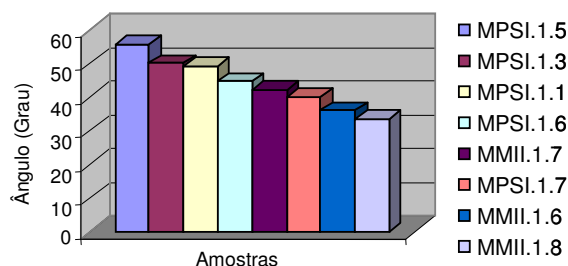


Figura 3.30 – Representação gráfica das amostras da Companhia das Lezírias em função do ângulo de torção.

Na análise à porosidade e para os valores obtidos para o número de poros por cm^2 foram utilizados provetes de cortiça da totalidade das 18 pranchas (Tabela 3.11). Os provetes correspondentes aos sobreiros MPNIII.1.1, MPSI.1.1, MPNIII.1.4, MMII.1.7, MPSI.1.3, MPNIII.1.3 e MPNIII.1.2, apresentam baixa porosidade, o que permite classificar estes sobreiros como árvores produtoras de cortiça de boa qualidade. Na classe mediana, com uma percentagem de porosidade entre 2 – 4%, incluíram-se os provetes dos sobreiros MPSI.1.7, MMII.1.6, MMII.1.2, MPNIII.1.6, MPSI.1.2 e MMII.1.3. Os restantes 5 provetes apresentaram uma elevada porosidade, ou seja, tinham uma porosidade superior a 4% tendo sido classificados na classe de sobreiros com má qualidade da cortiça.

Tabela 3.11 – Valores de porosidade agrupados de modo decrescente segundo as suas designações.

Amostras	Por	Designação	NP/cm ²	Amostras	Por	Designação	NP/cm ²
MPSI.1.5	13,03	Muito Porosa	5,02	MMII.1.6	2,38	Mediana	2,74
MMII.1.8	7,72		4,47	MPSI.1.7	2,18		2,38
MPSI.1.6	6,65		5,54	MPNIII.1.2	1,98	2,09	
MPNIII.1.5	5,38		3,77	MPNIII.1.3	1,97	3,03	
MMII.1.5	4,76		5,79	MPSI.1.3	1,68	Pouco Porosa	2,96
MMII.1.3	4,07	3,64	MMII.1.7	1,64	2,58		
MPSI.1.2	3,39	Mediana	5,12	MPNIII.1.4	1,02		1,58
MPNIII.1.6	2,86		3,44	MPSI.1.1	0,89	1,87	
MMII.1.2	2,43		2,93	MPNIII.1.1	0,46	0,93	

Com base nos valores obtidos para os diferentes parâmetros analisados, apresenta-se na Tabela 3.12 a distribuição das árvores pelas classes de qualidade.

Tabela 3.12 – Distribuição dos sobreiros da Companhia das Lezírias segundo três classes de qualidade.

Características morfológicas	Classes de qualidade		
	Boa	Média	Má
Calibre	MPSI.1.1 MPSI.1.3 MPSI.1.5 MPSI.1.6 MPSI.1.7 MMII.1.6 MMII.1.2 MMII.1.7 MMII.1.8	—	MPSI.1.2 MMII.1.3 MMII.1.5 MPNIII.1.1 MPNIII.1.2 MPNIII.1.3 MPNIII.1.4 MPNIII.1.5 MPNIII.1.6
Densidade	MPSI.1.3 MPSI.1.6 MPSI.1.7 MMII.1.6 MMII.1.8.	—	MPSI.1.1 MPSI.1.5 MMII.1.7
Força de torção	MPSI.1.1 MPSI.1.3 MMII.1.6	—	MPSI.1.5 MPSI.1.6 MPSI.1.7 MMII.1.7 MMII.1.8
Ângulo de torção	MPSI.1.1 MPSI.1.3 MPSI.1.5	MPSI.1.6 MPSI.1.7 MMII.1.7	MMII.1.6 MMII.1.8
Porosidade	MPSI.1.1 MPSI.1.3 MMII.1.7 MPNIII.1.1 MPNIII.1.2 MPNIII.1.3 MPNIII.1.4	MPSI.1.2 MPSI.1.7 MMII.1.2 MMII.1.3 MMII.1.6 MPNIII.1.6	MPSI.1.5 MPSI.1.6 MMII.1.5 MMII.1.8 MPNIII.1.5

Como conclusão da análise destes parâmetros para a Companhia das Lezírias pode indicar-se como árvores produtoras de cortiça de boa qualidade os sobreiros MPNIII.1.2, MPNIII.1.3, MPSI.1.3, MMII.1.7, MPNIII.1.4, MPSI.1.1 e MPNIII.1.1. Deste grupo, o sobreiro MPSI.1.3 pode considerar-se como o melhor produtor de cortiça uma vez que respeita todos os limites estabelecidos para cada parâmetro. O sobreiro MPSI.1.1 foi classificado como árvore produtora de cortiça de boa qualidade, apesar de ter uma densidade excessivamente má. O sobreiro MPSI.1.5, apesar de apresentar um óptimo ângulo de torção, manifesta valores não adequados para a força de torção, densidade e porosidade. Embora para os sobreiros MPNIII.1.1, MPNIII.1.2, MPNIII.1.3 e MPNIII.1.4 não fosse possível obter rolhas (baixo calibre), a análise relativamente à porosidade mostrou que podem ser árvores produtoras de boa cortiça.

3.5.4. Herdade da Espirra

Na Herdade da Espirra foram descortiçados, no ano de 2006, 29 sobreiros que foram incluídos neste estudo.

Relativamente ao calibre (Tabela 3.13), com um valor médio de 33,92mm, estes sobreiros distribuíram-se do seguinte modo: 4 na classe grossa (40-54mm), 14 na classe marca (32-40mm), 8 na classe meia-marca (27-32mm), 2 na classe delgada (22-27mm) e 1 na classe delgadinha (9-22mm).

Das pranchas incluídas nas classes delgada e delgadinha não foi possível a obtenção de rolhas, assim como das amostras MO6.20 e a PMR44.4, que embora apresentando um calibre dentro dos parâmetros tinham grandes lanhos que atravessavam a prancha das costas à barriga.

Tabela 3.13 – Valores de calibre da Herdade da Espirra agrupados segundo as suas designações.

Amostras	Calibre (mm)	Designação	Amostras	Calibre (mm)	Designação
MR14.2	47,98	Grossa	MO6.8	33,42	Marca
MO5.5	44,63		MR14a.1	32,43	
MR14.4	44,24		MO6.31	32,15	
PMR44a.26	40,36		PMR44a.4	31,13	Meia-marca
MR14.6	39,02	PMR42.12	30,43		
MR14a.2	38,89	PMR44.4	30,40		
PMR42.11	38,83	PMR44.11	30,24		
MO6.20	38,09	MO5.16	29,97		
PMR44a.28	36,90	Marca	PMR42.2	29,05	Delgada
MO6.26	36,00		MR14.12	28,39	
MO5.10	35,68		MR14a.5	28,34	
PMR44a.18	35,00		MO5.15	26,51	Delgadinha
PMR44a.14	34,54	MR14a.4	23,98		
MO5.7	34,34				
MR14a.3	33,93		MR14.7	18,74	

Pela análise da Figura 3.31, conclui-se que as amostras de cortiça que apresentam uma boa densidade, ordenadas por ordem decrescente, correspondem ao grupo constituído pelos sobreiros MR14.12 a PMR44a.18.

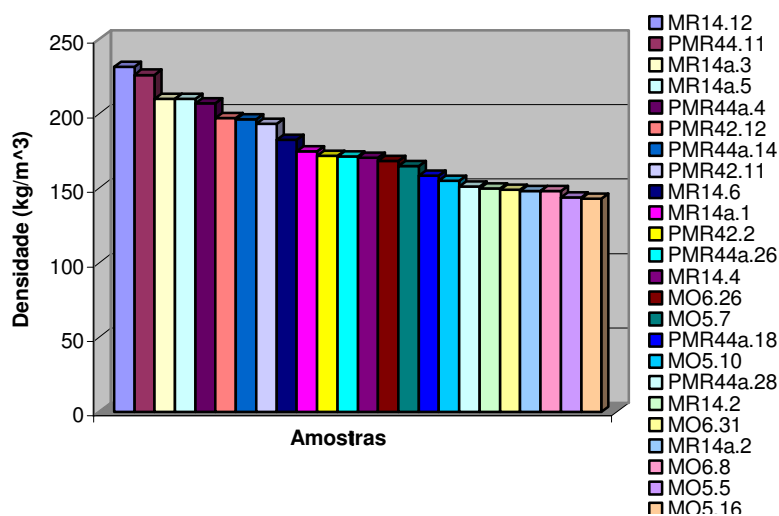


Figura 3.31 – Representação gráfica das amostras da Herdade da Espirra em função da densidade.

Nos ensaios de torção, os valores de força correspondentes a cortiça de boa qualidade estão entre os valores 0,96 e 1,25 daN, que correspondem às amostras MR14a.3 e MO6.26, respectivamente (Figura 3.32).

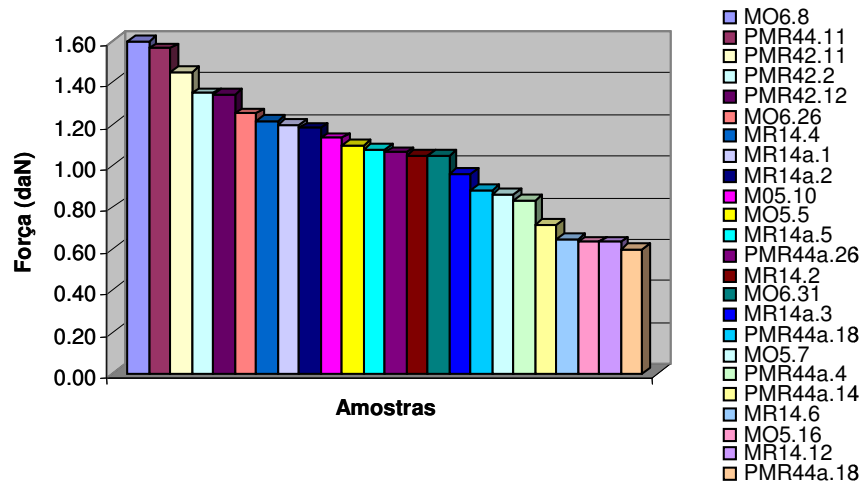


Figura 3.32 – Representação gráfica das amostras da Herdade da Espirra em função da força de torção.

Relativamente ao ângulo de torção (Figura 3.33), 4 amostras de rolhas podem ser classificadas como cortiça de muito boa qualidade, MO5.10, MO6.8, MR14.2 e MR14.4, ou seja, apresentam um ângulo de torção acima dos 50°. Na classe das rolhas com um bom ângulo de torção incluem-se a maior parte das amostras, desde PMR42.2 até a PMR44a.26 (ordenadas por ordem decrescente), pertencendo as restantes ao grupo das menos boas.

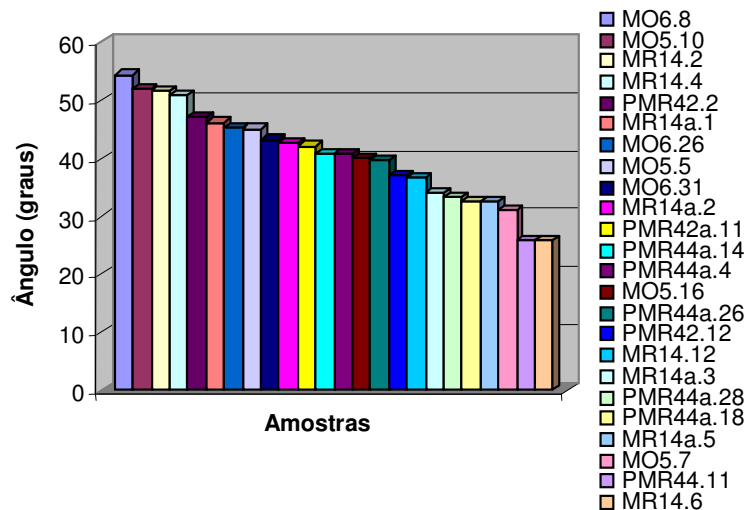


Figura 3.33 – Representação gráfica das amostras da Herdade da Espirra em função do ângulo de torção.

Tal como para o ângulo de torção, a porosidade e os valores de número de poros por cm² apresentados na Tabela 3.14, por ordem decrescente, também se divide em três classes. Na primeira classe, pouco porosa, a qual corresponde a provetes com uma porosidade inferior a 2%, pertencem os sobreiros desde PMR44.11 a MO6.8. À classe mediana, pertencem os provetes dos sobreiros desde MO6.31 a MO5.5 e na classe muito porosa, incluiu-se a maior parte dos provetes, ou seja, do sobreiro PMR42.11 ao sobreiro PMR44a.28.

Tabela 3.14 –Valores de porosidade da Herdade da Espirra agrupados segundo as suas designações e respectivos valores do número de poros por cm².

Amostras	Por	Designação	NP/cm ²	Amostras	Por	Designação	NP/cm ²
PMR42.11	44,24		11.44	MO6.31	3.90		2.54
MR14a.3	13,97		10.43	MR14.2	3.61		3.85
PMR44a.14	13,79		5.76	MO6.26	3.17	Mediana	4.13
MR14.12	11,54		5.76	MR14a.1	3.07		2.61
PMR42.12	9,92		8.31	MO6.20	2.65		2.41
MO5.10	9,59		4.02	MO5.5	2.54		2.19
MR14.6	8,58	Muito porosas	5.40	PMR44.11	1.81		2.41
PMR44a.26	8,48		5.55	PMR44.4	1.79		1.77
MO5.16	7,96		5.19	MO5.15	1.36		2.51
MR14a.5	7,33		8.98	MR14.4	1.27	Pouco porosas	2.32
PMR44a.18	6,91	8.71	MR14a.4	1.22	1.45		
MO5.7	4,55		5.25	MR14.7	0.99		1.80
PMR42.2	4,42		4.58	MR14a.2	0.92		2.12
PMR44a.4	4,30		3.96				
PMR44a.28	4,23		4.76	MO6.8	0.31		0.97

Da análise dos valores obtidos para os diferentes parâmetros, apresenta-se na Tabela 3.15 a distribuição dos 29 sobreiros pelas classes de qualidade.

Tabela 3.15 – Distribuição dos sobreiros da Herdade da Espirra segundo três classes de qualidade.

Características morfológicas	Classes de qualidade		
	Boa	Média	Má
Calibre	MR14.2 MO5.5 MO5.7 MO5.10 MO5.16 MO6.8 MO6.26 MO6.31 MR14.4 MR14a.1 MR14a.2 MR14a.3 MR14a.5 MR14.6 MR14.12 PMR42.2 PMR42.11 PMR42.12 PMR44.11 PMR44a.4 PMR44a.14 PMR44a.18 PMR44a.26 PMR44a.28	—	MO5.15 MO6.20 MR14a.4 MR14.7 PMR44.4
Densidade	MO5.7 MR14.4 MR14.6 MR14.12 MR14a.1 MR14a.3 MR14a.5 PMR42.2 PMR42.11 PMR42.12 PMR44.11 PMR44a.4 PMR44a.14 PMR44a.26	—	MO5.5 MO5.10 MO5.16 MO6.8 MO6.31 MR14a.2 MR14.2 PMR44a.18 PMR44a.28
Força de torção	MO5.5 MO5.10 MO6.26 MO6.31 MR14.2 MR14.4 MR14a.1 MR14a.2 MR14a.3 MR14a.5 PMR44a.26	MO6.8 PMR42.2 PMR42.11 PMR42.12 PMR44.11	MO5.7 MO5.16 MR14.6 MR14.12 PMR44a.4 PMR44a.14 PMR44a.18 PMR44a.28
Ângulo de torção	MO5.10 MO6.8 MR14.2 MR14.4	MO5.5 MO5.16 MO6.26 MO6.31 MR14a.1 MR14a.2 PMR42.2 PMR42.11 PMR44a.4 PMR44a.14 PMR44a.26	MO5.7 MR14.12 MR14.6 MR14a.3 MR14a.5 PMR42.12 PMR44.11 PMR44a.18 PMR44a.28
Porosidade	MO5.15 MO6.8 PMR44.11 MR14.4 MR14.7 MR14a.2 MR14a.4 PMR44.4	MO5.5 MO6.26 MO6.20 MO6.31 MR14.2 MR14a.1	MO5.10 MO5.7 MO5.16 MR14.6 MR14.12 MR14a.3 MR14a.5 PMR42.2 PMR42.11 PMR42.12 PMR44a.4 PMR44a.14 PMR44a.18 PMR44a.26 PMR44a.28

Tendo em consideração o conjunto dos parâmetros analisados, pode incluir-se no grupo de árvores produtoras de boa cortiça os sobreiros PMR44.4, MO5.15, MR14.4, MR14a.4, MR14.7, MR14a.2, MO6.26, MR14a.1 e MO6.20. Atendendo ao facto de que a porosidade é a característica mais relevante na definição de cortiça de boa qualidade, pode ainda incluir-se neste grupo as árvores MO5.5, MO6.8, MO6.31 e MR14.2, uma vez que a densidade não é tão preponderante na classificação de qualidade como as restantes quatro características.

Da análise das características físicas dos sobreiros localizados nas 4 Herdades as árvores seleccionadas como árvores produtoras de cortiça de boa qualidade são as referidas na Tabela 3.16.

Tabela 3.16 – Sobreiros seleccionadas como produtoras de cortiça de boa qualidade nas 4 Herdades.

Herdade	Sobreiro
Monte Fava	B7/1, B7/5, B7/7, B7/14, B9/13, B10/11, B15/9, M25
Palma	VC2.14, VC2.15, VC5.1
Lezírias	MPSI.1.1, MPSI.1.3, MMII.1.7, MPNIII.1.1, MPNIII.1.2, MPNIII.1.3, MPNIII.1.4
Espirra	MO5.5, MO5.15, MO6.8, MO6.20, MO6.26, MO6.31, MR14.2, MR14.4, MR14.7, MR14a.1, MR14a.2, MR14a.4, PMR44.4

3.6. Análise das características físicas da cortiça por métodos de taxonomia numérica

Para a análise estatística das características da cortiça recorreu-se igualmente aos métodos de taxonomia numérica, preparando-se previamente a matriz de dados, apresentada no Anexo D, com 71 linhas correspondentes às árvores analisados e com 7 colunas relativas às características físicas da cortiça e com valores omissos para as amostras cujas pranchas não permitiram a obtenção de rolhas.

Na Figura 3.34, apresenta-se o fenograma de distâncias obtido a partir dos dados standardizados. O coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0.991, o que indica que o fenograma é uma representação aceitável da respectiva matriz.

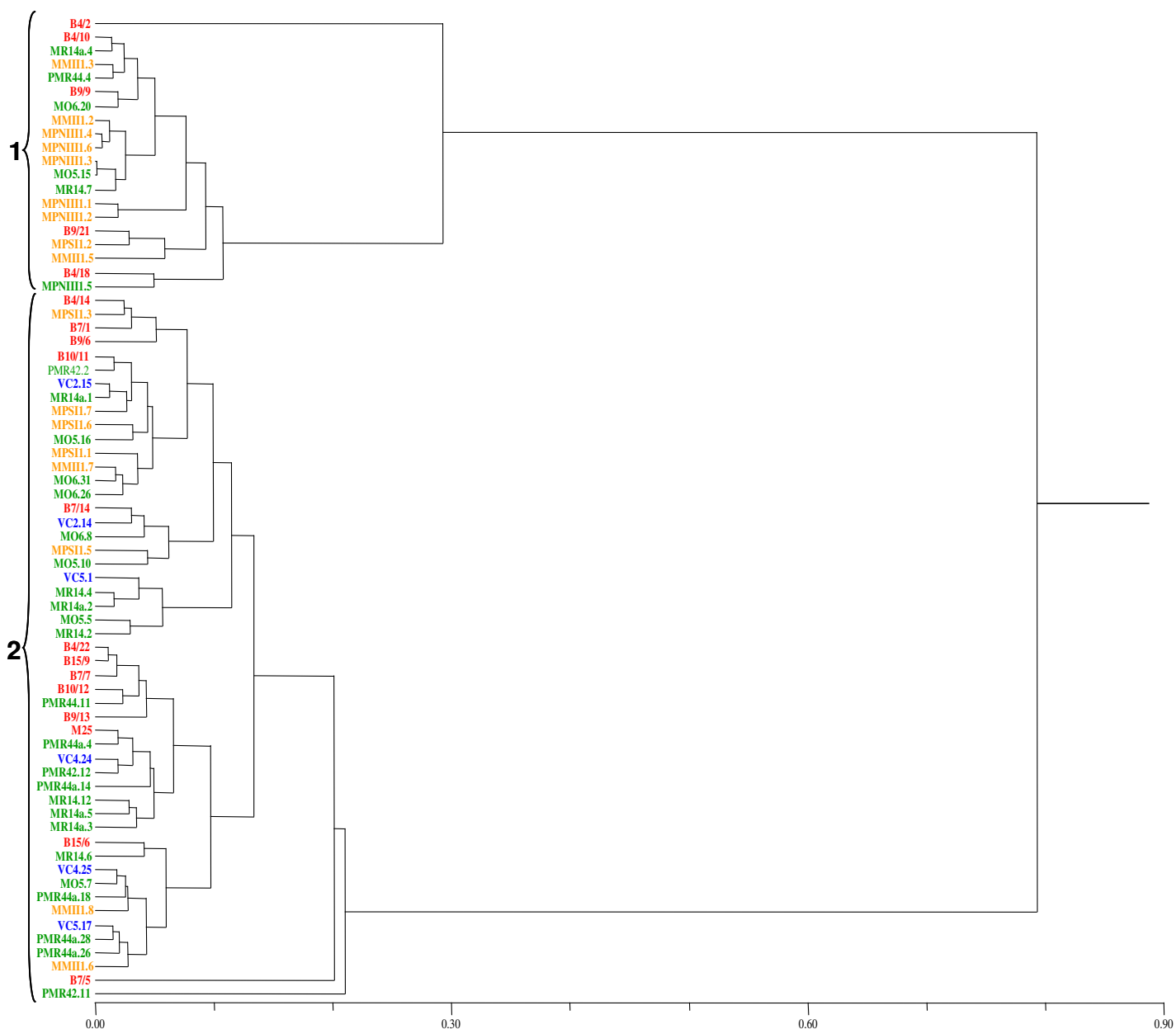


Figura 3.34 - Fenograma das 71 árvores baseado no método UPGMA aplicado à matriz de distâncias (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,991$).

Da sua análise verifica-se que as características físicas da cortiça não permitem, distintamente, separar as 71 árvores. Na tentativa de se agruparem as árvores, podem definir-se 2 agrupamentos, sendo o agrupamento 1 constituído por 5 subagrupamentos e o agrupamento 2 por 8 subagrupamentos e 2 árvores isoladas. Considerando-se as localizações destas árvores nas parcelas e estas nas respectivas Herdades, pode verificar-se que não há uma agregação das árvores com base na zona de localização das parcelas, ou seja, não há uma hierarquia clara que leve à separação dos agrupamentos. Por outro lado, verifica-se também que as árvores consideradas produtoras de cortiça de boa qualidade seleccionadas com base na descrição física (Tabela 3.16) se encontram distribuídas pelos vários subagrupamentos do agrupamento 2.

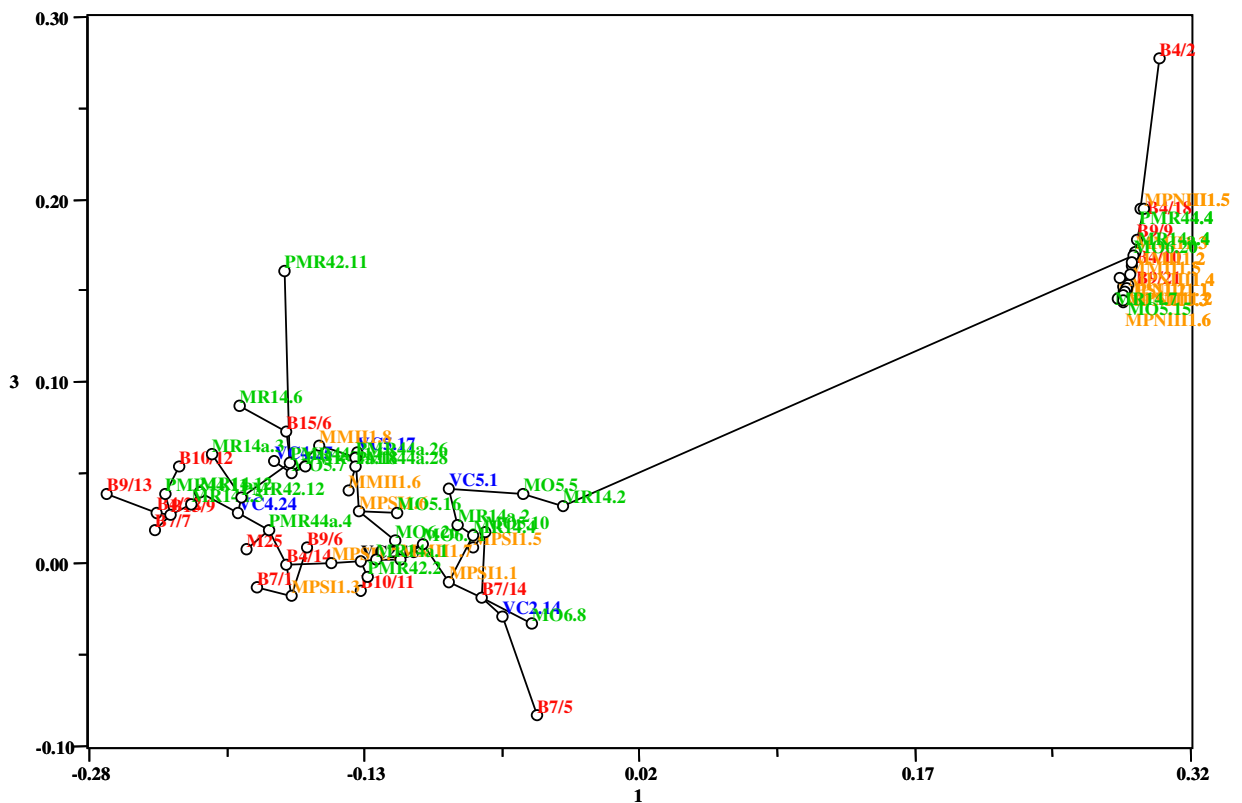


Figura 3.36 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 71 árvores no plano definido pela primeira componente principal (58,49%) e pela terceira componente principal (14,74%) com base nas características morfológicas da cortiça

Ao sobrepor-se a árvore de conexão mínima, esta permite detectar dois agrupamentos de árvores os quais são consistentes com os agrupamentos 1, 2 detectados no fenograma.

Relativamente à análise das características físicas da cortiça, a análise das suas projecções nas três primeiras componentes principais, mostra a importância relativa de cada variável na disposição espacial das árvores. Na Figura 3.37 representam-se as projecções das variáveis físicas da cortiça nas primeira e segunda componentes principais.

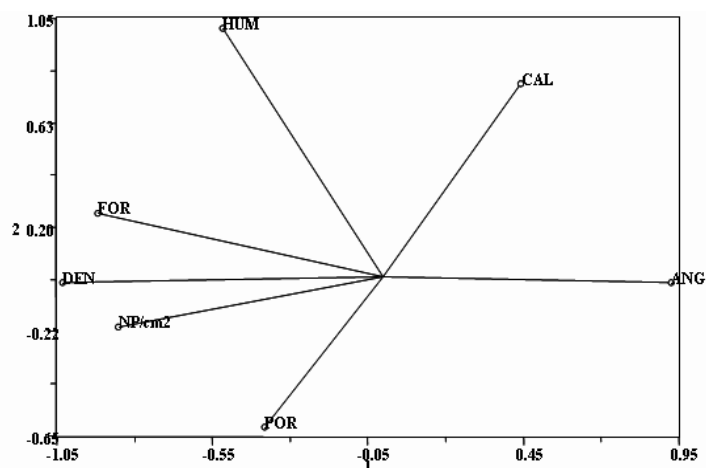


Figura 3.37 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das duas primeiras componentes principais.

Sobrepondo as projecções das características físicas da cortiça nas primeira e segunda componentes principais às projecções das árvores com base nas variáveis da cortiça, verifica-se que a primeira componente principal separa as árvores pela ângulo de torção, força de torção, número de poros e densidade. Embora as três características tenham uma influência negativa na qualidade da cortiça, verifica-se que pela projecção das árvores, os agrupamentos referidos na Figura 3.35 não são fortemente influenciados por nenhuma característica. A segunda componente principal separa as árvores pela humidade, calibre e porosidade, sendo que apenas o calibre influencia ligeiramente as árvores do primeiro agrupamento.

Na Figura 3.38 apresentam-se as projecções das características morfológicas da cortiça nas primeira e terceira componentes principais.

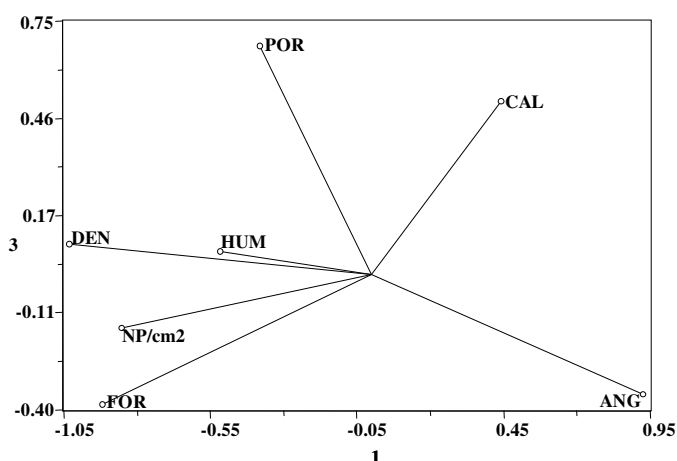


Figura 3.38 – Projecções das 7 características morfológicas da cortiça, no plano da primeira e terceira componentes principais.

Tal como para a projecção das 7 características físicas da cortiça no plano da primeira e segunda componentes, para o plano da primeira e terceira componentes verifica-se que as árvores de ambos os agrupamentos não são fortemente influenciadas por nenhuma destas características.

No Anexo C, encontra-se a análise das características físicas da cortiça por métodos de taxonomia numérica para cada herdade de modo a melhor se perceber os resultados para o estudo conjunto das quatro herdades.

3.7 Estabelecimento de possíveis correlações entre a análise molecular e as características físicas da cortiça

Comparando as árvores produtoras de boa cortiça localizadas na extremidade esquerda da primeira componente principal com os agrupamentos anteriormente obtidos para as 73 árvores com base no estudo molecular (Figura 3.32), verificamos que estas árvores se distribuem ao longo do fenograma, não estando ligadas entre si.

Numa análise mais detalhada e considerando os sobreiros referidos como produtores de boa cortiça, seleccionados com base na análise morfológica da cortiça (Tabela 3.16), e analisando os respectivos produtos amplificados para a PAL (Figura 3.2) verifica-se que existem polimorfismos, o que não permite estabelecer uma correlação entre a cortiça destes sobreiros e estas regiões codificantes da PAL.

Para os sobreiros pertencentes ao grupo classificado como produtores de cortiça de boa qualidade e localizados na Herdade do Monte Fava (Figura 3.39) verifica-se também que nas sequências obtidas para as regiões codificantes das proteínas dirigentes existem quatro locais polimórficos. Estes resultados também não permitem o estabelecimento de correlações.

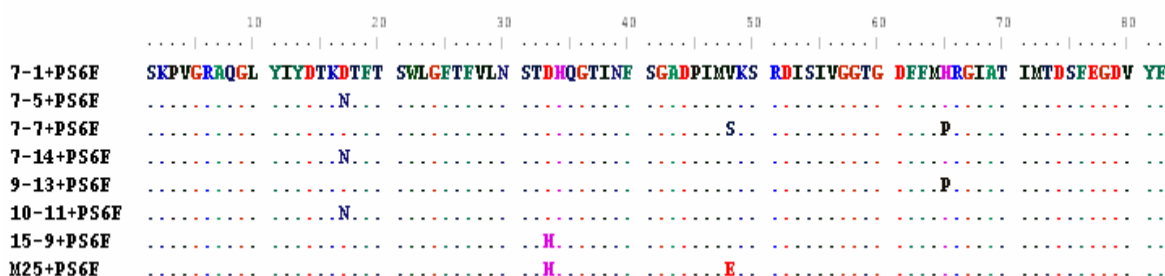


Figura 3.39 — Alinhamento das sequências peptídicas dos 8 sobreiros da Herdade do Monte Fava produtores de cortiça de boa qualidade (Geneious 2.5.2).

4. Considerações Finais e perspectivas

Considerações Finais:

Este trabalho abordou um conjunto de questões convergentes para o objectivo de alargar os conhecimentos sobre o sobreiro e permitiu obter alguns avanços que se circunscrevem ao esclarecimento da variabilidade genética e possíveis correlações com a qualidade da cortiça.

O conhecimento adquirido, fundamental e valioso para a investigação desta espécie, permitirá estabelecer propostas futuras com maior rigor.

Em termos agregados e sob o ponto de vista genómico, o estudo dos polimorfismos genómicos permite apontar as seguintes conclusões:

- Dos vários *primers* utilizados na amplificação das regiões codificantes da PAL apenas o conjunto PAL1/PAL2 apresentou polimorfismo;
- A análise estatística dos resultados da PAL para esta região demonstrou que os sobreiros apresentam entre si grandes variabilidades genéticas;
- 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 polimorfismo revelado e a variabilidade genética intrapopulacional existente, não nos permitiu diferenciar as árvores analisadas. Uma hipótese explicativa destes agrupamentos seria baseada na distribuição geográfica mas verificámos que a distribuição das árvores é independente da sua localização;
- Tal como relatado para outras plantas, em *Q. suber* também ocorrem proteínas dirigentes que podem participar na síntese da lenhina e/ou da suberina, uma vez que as sequências nucleotídicas dos produtos PCR assim como as sequências peptídicas pelos mesmos codificadas correspondem às de proteínas dirigentes relatadas para outras plantas;
- Nas regiões codificantes destas proteínas estudadas existe polimorfismo nucleotídico que pode estar relacionado com a síntese da lenhina.

Sob o ponto de vista da caracterização morfológica da cortiça, pode concluir-se que:

- Foram analisadas as características físicas mais importantes que estão directamente relacionadas com a qualidade das pranchas e das rolhas,
- A selecção de árvores produtoras de cortiça de boa qualidade com base nas sete características analisadas não é um processo fácil;
- Com base nestas características não foi possível agrupar as árvores utilizando métodos de taxonomia numérica.

Como conclusão final pode referir-se que existe uma grande diversidade entre árvores e entre zonas de sobreiro, demonstrada pela análise dos resultados moleculares e das características da cortiça, por métodos de taxonomia numérica.

Provavelmente pela complexidade dos fenómenos envolvidos, não foi possível detectar diferenças que permitissem distinguir sobreiros e populações, e estabelecer relações entre os sobreiros, através dos perfis electroforéticos da PAL e das sequências nucleotídicas das regiões codificantes das proteínas dirigentes e a qualidade da cortiça, o que significa que as regiões genómicas analisadas não estão geneticamente correlacionadas com a qualidade da cortiça.

Perspectivas:

Deste modo, e com intuito de aumentar o conhecimento acerca do sobreiro, as perspectivas para o prosseguimento destes estudos são:

- Recolher um maior número de amostras de cortiça e folhas das 4 herdades, mas fundamentalmente da Herdade de Palma, e também de outras herdades de regiões distintas do país de modo a ter uma maior e mais fiel amostragem para comparação entre os perfis electroforéticos e as características físicas da cortiça.
- Os resultados decorrentes deste estudo para as proteínas dirigentes permitirão o desenvolvimento de marcadores moleculares para o diferenciamento de sobreiros produtores de cortiça de boa e má qualidade.
- Caracterização dos genes da PAL de um sobreiro produtor de cortiça de boa e má qualidade.
- Com base nos resultados da sequenciação tanto para a PAL como para as proteínas dirigentes, desenhar novos *primers* e aprofundar os conhecimentos sobre os fragmentos de interesse.

-
- Criação de uma escala específica, a partir de um conjunto de dados de características físicas e químicas da cortiça. Para tal, será fulcral estipular um número mínimo de variáveis que permita caracterizar a cortiça segundo a sua qualidade.
 - É ainda de realçar, que sendo o sobreiro uma das principais fontes económicas de Portugal, e dado o aumento da perda de vitalidade dos sobreiros, é fundamental aumentar os estudos nesta árvore. Como dizia já há algumas décadas o maior estudioso da cortiça de Portugal:

"A nossa riqueza corticeira não é saco sem fundo. Urge proteger eficazmente os sobreirais, se não queremos que esta grande riqueza, que nos dá no mundo tão invejada posição, passe a ser mais uma das glórias do passado, um dos tantos bens que tivemos nas mãos e deixámos perder como incorrigíveis perdulários".

J. V. Natividade

5. Bibliografia

Allwood, E., Davies, D., Ellis, B., Bolwell, G., **1999**. Phosphorilation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Lett.* 457: 47-52.

Andrade, A., **1984**. Dispositivo para ensaios de torção de rolhas, *Cortiça*, 545, 87-94.

Bernards, A., Lopez, M., Zajicek, J., Lewis, G., **1995**. Hydroxycinnamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin. *J. Biol. Chem.* 270: 7382-7386.

Bernards, M., Summerhurst, D. & Razem, F., **2004**. Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection. *Phytochemistry Reviews* 3: 113–126.

Bolwell, G., Bell, J., Cramer, C., Schuch, W., Lamb, C., Dixon, R., **1985**. Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*. Characterization and differential induction of multiple forms elicitor treated cell suspension cultures. *Europ. J. Biochem.* 149: 411-419.

Bolwell, G., **1992**. A role for phosphorilation in the down-regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension cultured cells of French bean. *Phytochemistry.* 31: 4081-4086.

Carneiro, L., **1987**. Aplicação da métodos de taxonomia numérica à ampelografia de *Vitis vinífera* L.. Tese de Doutoramento ISA, Universidade Técnica de Lisboa.

Carvalho, A., **1993**. Relatório Final/PEDIP I / Prog. 5 "Qualificação de Amadias Preparadas".

Carrapiço, F., **1998**. Tecidos Vegetais: estrutura e enquadramento evolutivo. Departamento de Biologia Vegetal/Secção de Biologia Celular e Biotecnologia Vegetal.

Cochrane, F., Davin, L., Lewis, N., **2004**. The Arabidopsis phenylalanine ammonia-lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry*. 65: 1557-1564.

Cordeiro, N., Aurenty, P., Belgacem, M., Gandini, A., Neto, C., **1997**. Surface properties of suberin. *J. Colloid Interface Sci.* 187(2): 498-508.

Cordeiro, N., Belgacem, M., Silvestre, A., Neto, C., Gandini, A., **1998**. Cork suberin as a new source of chemicals. 1. Isolation and chemical characterization of its composition. *Int. J. Biol. Macromol.* 22(2): 71-80.

Costa, A., Pereira, H. e Oliveira, A., **2001**. Dendroclimatological approach to diameter growth in cork oak adult trees under cork production. *Trees*, 15, 438-443.

Costa, A., Pereira, H. e Oliveira, A., **2003**. Variability of radial growth in cork oak adult trees under cork production. *Florest Ecology and Management*, 171, 231-241.

Costa, A., Pereira, H. e Oliveira, A., **2004**. The effect of cork stripping on diameter growth of *Quercus suber* L. *Forestry*, 77, 1-8.

Davin, L., Wang, H., Crowell, A., Bedgar, D., Martin, D., Sarkanem, S., Lewis, N., **1997**. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* 275, 362–366.

Davin, L., & Lewis, N., **2000**. Dirigent Proteins and Dirigent Sites Explain the Mystery of Specificity of Radical Precursor Coupling in Lignan and Lignin Biosynthesis. *Plant Physiol*, 123 (2): 453-462.

Dixon, R. e Paiva, N., **1995**. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7: 1085-1097.

DGRF, Direcção Geral dos Recursos Florestais, **2007**. 5º Inventário Florestal Nacional.

Doyle, J.J. & Doyle, J. L., 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12: 13-15.

Dvornyk, V., Sirvio, A., Mikkonen, M., Savolainen, O., 2002. Low nucleotide diversity at the *pal1* locus in the widely distributed *Pinus silvestris*. *Mol. Bio. Evol.* 19 (2): 179-188.

Fialho, C., Lopes, F. e Pereira, H., 2001. The effect of cork removal on the radial growth and phenology of young cork oak trees. *Forest Ecology and Management* 141, 251-258.

Fonseca, F., Louzada, J., Pestana da Silva, M. e Gomes, C., 1992. Determinação da porosidade da cortiça com sistema de análise de imagem por computador e estudo preliminar da sua variação por classes de qualidade. Simposio Mediterraneo sobre Regeneration del Monte Alcornocal, Instituto de Promocion del corcho, Mérida, pp 305-193.

Fonseca, F., 2000. Variação e Determinismo Fenotípico da Porosidade. A Reacção do Sobreiro à Formação da Cortiça. Congresso Mundial do Sobreiro e da Cortiça, Lisboa.

Fortes, M. A., 1989. A Cortiça. Colóquio Ciências 4, Jan/Abr: 35-60.

Fortes, M., Rosa, M., Pereira, H., 2004. A Cortiça. IST Press, Instituto Superior Técnico.

Fujita, M., Gang, D., Davin, L., Lewis, N., 1999. Recombinant pinoresinol-lariciresinol reductases from western red cedar (*Thuja plicata*) catalyze opposite enantiospecific conversions. *J. Biol. Chem*, 274 (2): 618-627.

Fukushima, R. & Hatfield, R., 2001. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. *J. Agricultural Food Chem*, 49 (7): 3133-3139.

Gang, D., Costa, M., Fujita, M., Dinkova-Kostova, A., Wang, H., Burlat, V., Martin, W., Sarkanen, S., Davin, L., Lewis, N., **1999**. Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chem. Biol.* 6: 143-151.

Gibson, L. e Ashby, M., **1997**. *Celular solids, structure and properties*. 2ª edição, Cambridge University Press.

Gil, M., Lopes, M., Rocha, Neto, C., **1997**. A ¹³C solid state nuclear magnetic resonance spectroscopic study of cork cell wall structure: The effect of suberin removal. *Int. J. Biol. Macromol.* 20: 293-305.

Gil, L., **1998**. *Cortiça. Produção, Tecnologia e Aplicação*. INETI, Lisboa.

Graça, J. e Pereira, H. **1997**. Formação e desenvolvimento da primeira *periderme* no sobreiro. Relações com as características da cortiça amadia. Departamento de Engenharia Florestal, Instituto Superior de Agronomia.

Graça, J. e Pereira, H., **2004**. The periderm development in *Quercus suber* L.. *International Association of Wood Anatomists Journal*.

Hahlbrock, K., Scheel, D., **1989**. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 40:347-369.

Hunter, P. and Gaston, M., **1988**. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2465-2466.

Joos, H. & Hahlbrock, K., **1992**. Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression. *Europ. J. Biochem.* 204(2): 621-629.

Kao, Y., Harding, S., Tsai, C., **2002**. Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant Physiol.* 130 : 796-807.

Kumar, A., and Ellis, B., 2001. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression and evolution. *Plant Physiol.* 127:230-239.

Liang, X., Dron, M., Cramer, C., Dixon, R., Lamb, C., 1989. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase gene during plant development and by environmental cues. *J. Biol. Chem.* 246: 14486-14492.

Liyama, L., 1994. Covalent cross-links in the cell walls. *Plant Physiol.*, 104 (2): 175-183.

Lois, R., Dietrich, A., Halbrock, K., Scultz, W., 1989. A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO J.* 8:1641-1648.

Lopes, M., Oil, A., Silvestre, A., Neto, C., 2000a. Composition of suberin extracted upon gradual methanolysis of *Quercus suber* L. cork. *J. Agric. Food Chem.* 48: 383-391.

Lopes, M., Sarychev, A., Neto, C., Gil, A., 2000b. Spectra editing of ¹³C CP/MAS NMR spectra of complex systems: application to the structural characterization of cork cell walls. *Solid State NMR* 16: 109-121.

Lulai, E., Morgan, W., 1992. Histo-chemical probing of potato periderm with neutral red: a sensitive cytofluorochrome for the hydrophobic domain of suberin. *Biotech. Histochem* 67(4): 185-195.

Marques, A., Pereira, H., Meier, D., Faix, O., 1994. Quantitative analysis of cork (*Quercus suber* L.) and milled cork lignin by FTIR spectroscopy, analytical pyrolysis and total hydrolysis. *Holzforschung.* 48: 43-50.

Mauch-Mani, B., and Slusarenko, A., 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peonospora parasitica*. *Plant. Cell.* 8: 203-212.

Micheli, V., Jacomeli, G., Fioravnti, A., Morozzi, G., Marcolongo, R. e Pompucci, G., 1997. Thiopurine methyltransferase activity in the erythrocytes of adults and children and HPLC linked assay. *Chimica Acta* 259: 161-168.

Moreira, I., 1980. Histologia Vegetal. Didática Editora, Lisboa.

Natividade, J., 1950. Subericultura. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. DGF, 387 pp.

Neto, C., Cordeiro, N., Seca, A., Domingues, F., Gabdini, A., Robert, D., 1996. Isolation and characterization of a lignin-like polymer of the cork of *Quercus suber* L. *Holzforschung*. 50: 563-568.

Ni, W., Fahrendorf, T., Ballance, G., Lamb, C., Dixon, R., 1996. Stress responses in alfalfa. Transcriptional activation of phenylpropanoid pathway genes in elicitor-induced cell suspension cultures. *Plant. Mo. Biol.* 30:427-438.

Nóbrega, F., 1996. Polimorfismo isoenzimático em *Quercus suber* L.. Contribuição para o estudo da sua relação com a qualidade da cortiça. Tese de Doutoramento. ISA, Univ. Técnica de Lisboa.

Nóbrega, F., Vidal, R., Bruno de Sousa, C., Bruno de Sousa, R., Sardinha R., 2000. Estudos moleculares no sobreiro, *Quercus suber* L.. Detecção de proteínas associadas com a suberina. *Silva Lusitana*, 8 (2): 135-148.

Önnerud, H., 2002. Polymerization of Monolignols by Redox Shuttle-Mediated Enzymatic Oxidation A New Model in Lignin Biosynthesis I. *The Plant Cell*, 14 (8): 1953-1962.

Pereira, H., Rosa, M. e Fortes M., 1987. The cellular structure and compressive properties of cork *Quercus suber* L. *International Association of Wood Anatomists Bulletin*, 8, 213-218.

Pereira, H., 1993. Qualidade e processamento da cortiça. Relatório Final – PEDIP I/ Prog. 5.

Pereira, H., 1999. O calibre e a porosidade como parâmetros da qualidade tecnológica da cortiça em pranchas. *Revista Florestal*, XI (2), 46-50.

Pestana da Silva, M., 2003. A Caracterização da qualidade da cortiça para a produção de rolha. Aplicação de metodologia de análise multivariada com vista à validação de grupos de qualidade. Tese de Doutoramento UTAD.

Pestana da Silva, M., Louzada, J. e Sardinha, R., 2005. Classificação das Cortiças para a Produção de Rolha, Recorrendo a um Critério Objectivo. Parte I – As Rabanadas. *Silva Lusitana*, 13 (1): 51-73.

Raes, J., Rohde, A., Christensen, J., Van De Peer, Y., Boerjan, W., 2003. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, V.133, n.3, p.1051-1071.

Rasmussen, S. and Dixon, R., 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channelling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell*. 11: 1537-1551.

Reis, A., 1986. Alterações verificadas nas dimensões da cortiça durante a cozedura – uma primeira análise. *Cortiça*, 568, 45-49.

Reis, A., 1995. Conhecimento da humidade a que se referem a quantidade e o preço da cortiça cordados para efeitos de transação comercial. Instituto Florestal/ DEEE, Lisboa

Rohlf, F., 1992. NTSYSpc. Numerical taxonomy and multivariate analysis in horticultural science. *Hort. Science* 8(1): 17-22.

Rookes, J. and Cahill, D., 2003. A PAL1 gene promoter green fluorescent protein report system to analyse defence responses in live cells of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 83-94.

Rosa, M. e Fortes, M., 1991. Deformation and fracture of cork in tension. *Journal of Materials Science*, 26, 341-348.

Rosa, M. e Fortes, M., 1993. Water absorption by cork. *Wood and Fiber Science*, 25, 339-348.

Sarma, A., Sreelakshimil, Y., Sharma, R., 1998. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. *Phytochemistry*. 49: 2233-2243.

Schuster, B., Retey, J., 1994. Serine-202 is the putative precursor of the active site dehydroalanine of phenylalanine ammonia-lyase. *FEBS Lett.* 349: 252-254.

Shannon, C., 1948. A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, Vol. 27, pp. 379–423.

Shufflebottom, D., Edwards, K., Schuch, W., Bevan, M., 1993. Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns. *Plant. J.* 3: 835-845.

Simpson, E., 1949. Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688.

Sneath, P. and Sokal, R., 1973 (Citado por Carneiro, L., 1987).

Sokal, R. and Michener, C., 1958 (Citado por Carneiro, L., 1987).

Sokal, R. and Rohlf, F., 1962 (Citado por Carneiro, L., 1987).

Stark, E., Garbow, J., 1992. Nuclear magnetic resonance relaxation studies of plant polyester dynamics. Suberized potato cell wall. *Macromolecules* 25: 149-154.

Taco, C., Lopes, F. e Pereira, H., 2004. La variation dans l'arbre de l'épaisseur du liège et du dos des planches pour des chênes liège en pleine production. Anais do Instituto Superior de Agronomia.

Teixeira, G., Nóbrega, F. & Vidal, R., 2002. Micromorphological and histochemical data on *Quercus suber* leaves. in “Livro de Resumos da XXXVII Reunião Annual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica e Biologia Celular” realizada na Universidade da Madeira, Funchal: pag 20.

Varanda, J., 1984. Caracterização das rolhas. Boletim Instituto dos Produtos Florestais – *Cortiça* 554: 369-372.

Vinagre, P., Santos, L., Nóbrega, F., Varela, M., 2005. Estudos comparativos entre as duas primeiras frutificações do sobreiro: bastão e lande. Publicado nas *Actas do 5º Congresso Florestal Nacional*, realizado em Viseu, 16-19 de Maio.

Ward, J., 2001. Identification of novel families of membrane proteins from the model plant *Arabidopsis thaliana*. Department of Plant Biology, University of Minnesota, 220 Bioscience Center, Vol. 17 (6): 560–563.

Xia, Z., Costa, M., Proctor, J., Davin, L. and Lewis, N., 2000. Dirigent-mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry* 55: 537-549.

WEBSITES:

- [1] - <http://alfa.ist.utl.pt/~ncmrp/p%20ambiente.htm>
- [2] - <http://www.logistica-florestal.pt/>
- [3] - <http://www.flyanglersonline.com>
- [4] - <http://www.amorim-group.pt>
- [5] - <http://www.ctcor.com>
- [6] - <http://www.dapp.min-edu.pt>
- [7] - <http://www.naturlink.pt>
- [8] - <http://www.lecb.ncifcrf.gov/>
- [9] - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [10] - <http://www.zaquicork.com>

Anexo A. Figuras referidas no capítulo da Introdução

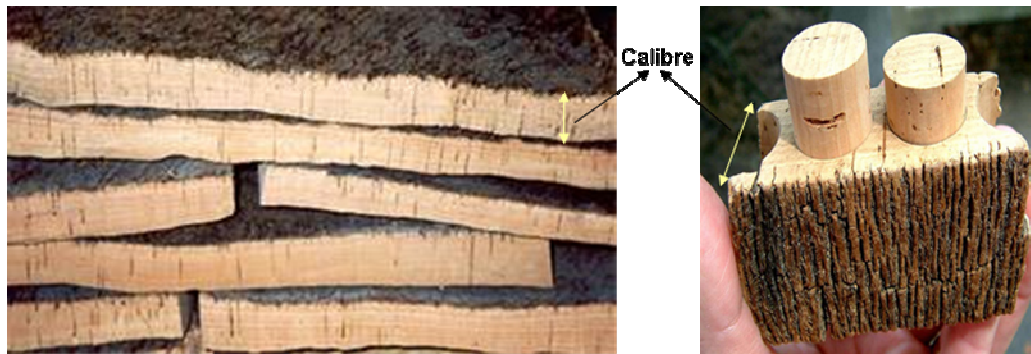


Figura A.1 – Calibre de uma prancha de cortiça [10].

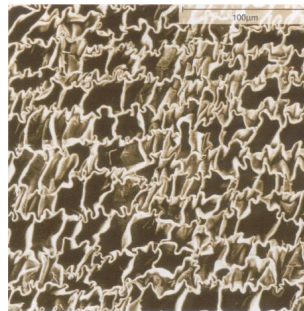


Figura A.2 – Microfotografia da secção transversal de um provete de cortiça virgem obtido por microscopia electrónica de varrimento onde se observam Paredes celulares fortemente onduladas devido a fortes tensões de compressão resultantes do crescimento radial (Fortes *et al.*, 2004).

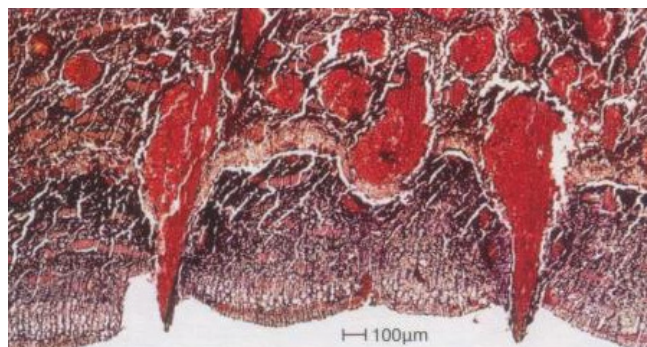


Figura A.3 – Regeneração de um flogénio gerando para o seu exterior células suberosas de cortiça (na parte superior da microfotografia) e, para o seu interior, células da feloderme (na parte inferior da microfotografia) (Fortes *et al.*, 2004).

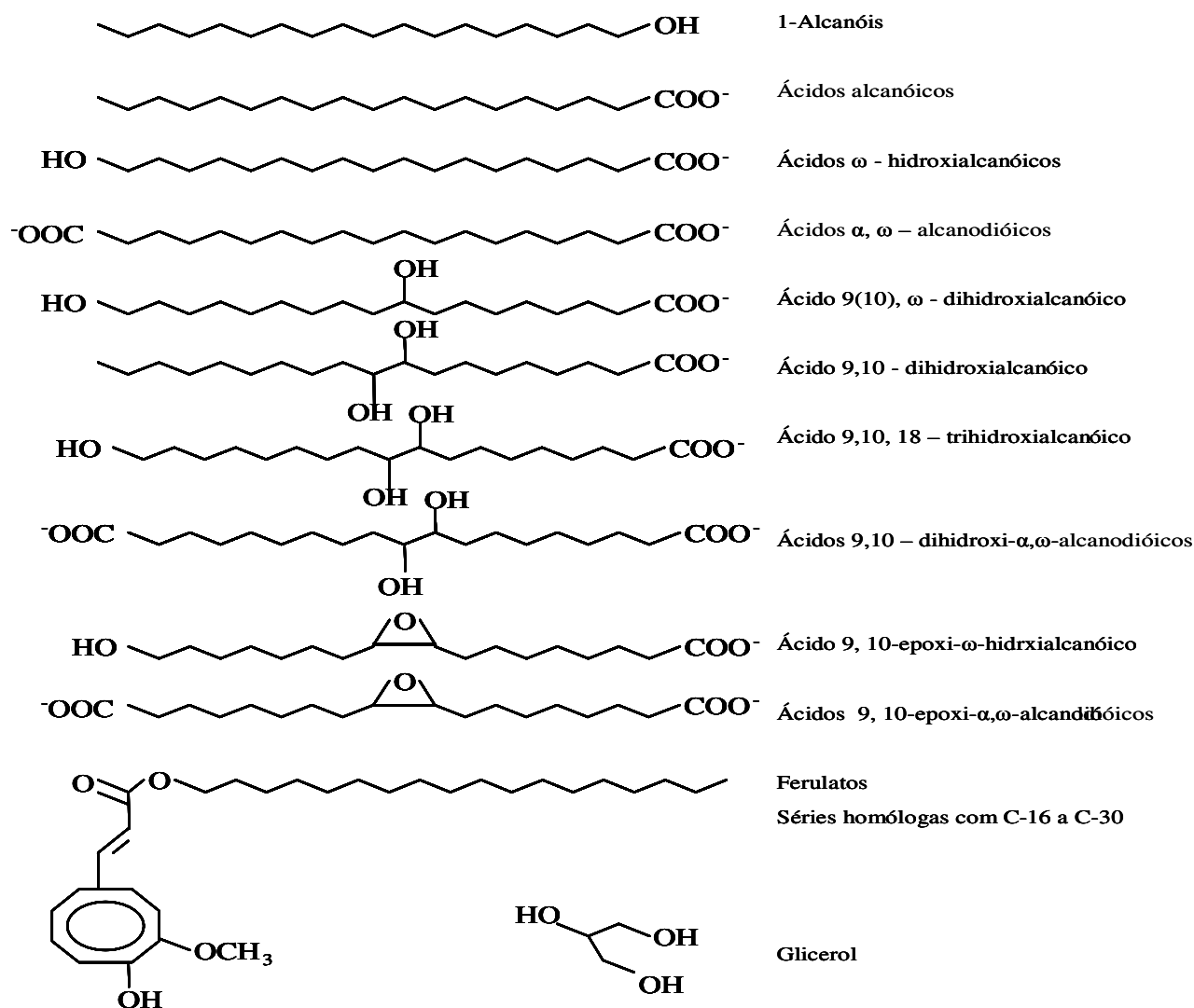


Figura A.4 – Precursores alifáticos da suberina (Bernards, 2002).

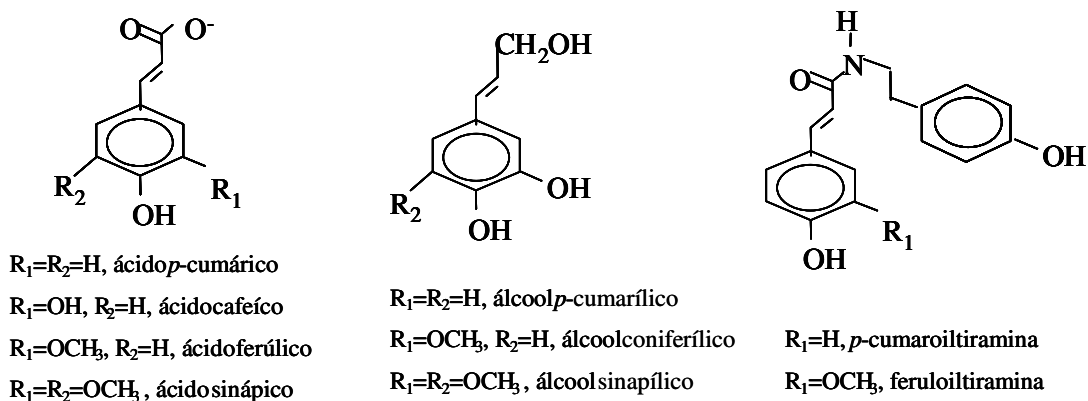


Figura A.5 – Precursores fenólicos da suberina (Bernards, 2002).

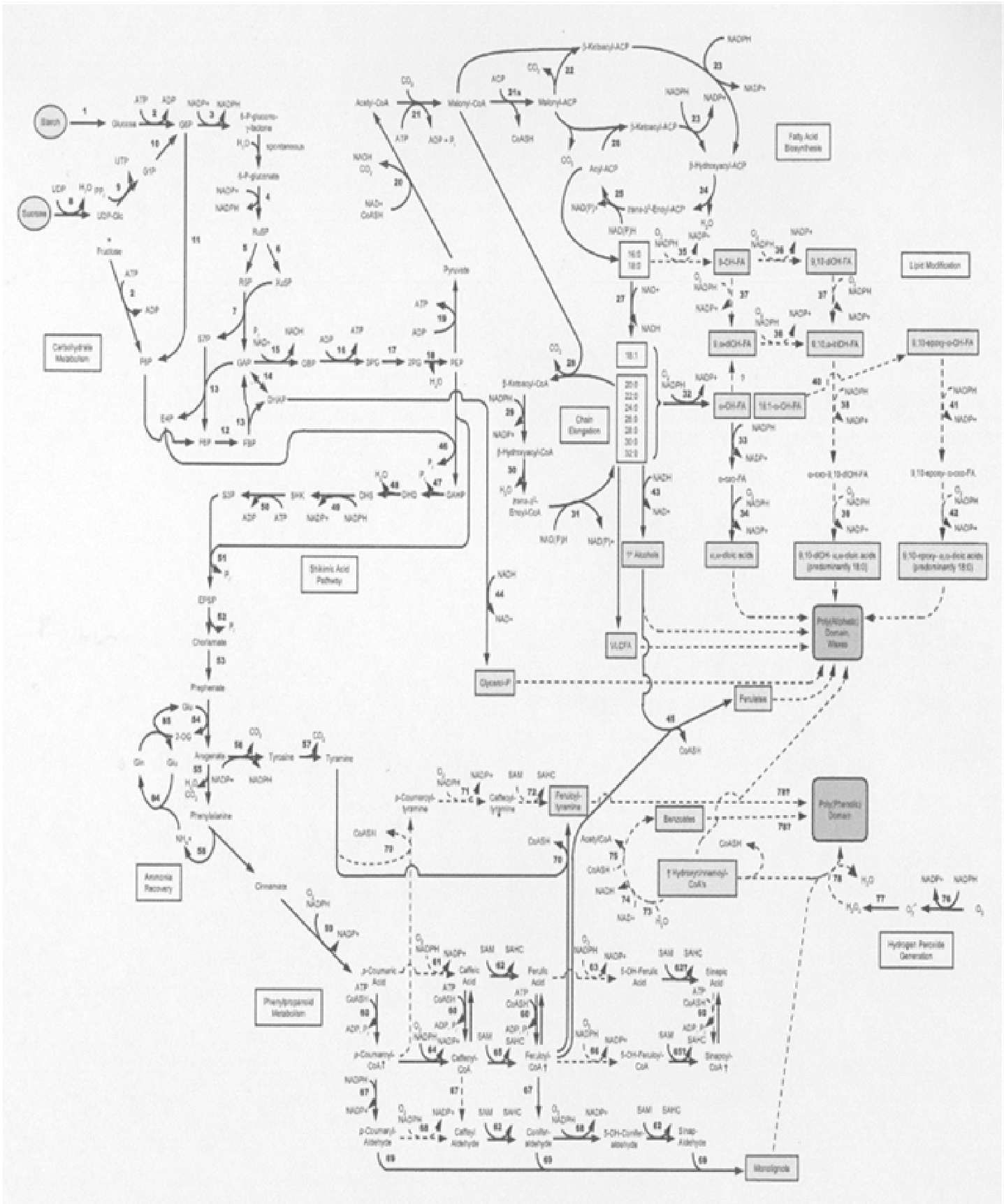


Figura A.6 – Esquema geral da biossíntese para os precursores dos domínios polialifáticos e polifenólicos da suberina, onde estão representadas as reacções da biossíntese conduzindo aos precursores lipídicos

e fenilpropanóides do SPAD (e ceras associadas) e do SPPD, começando com amido e sacarose (as duas principais fontes de carbono nas plantas) (Bernards, 2002).

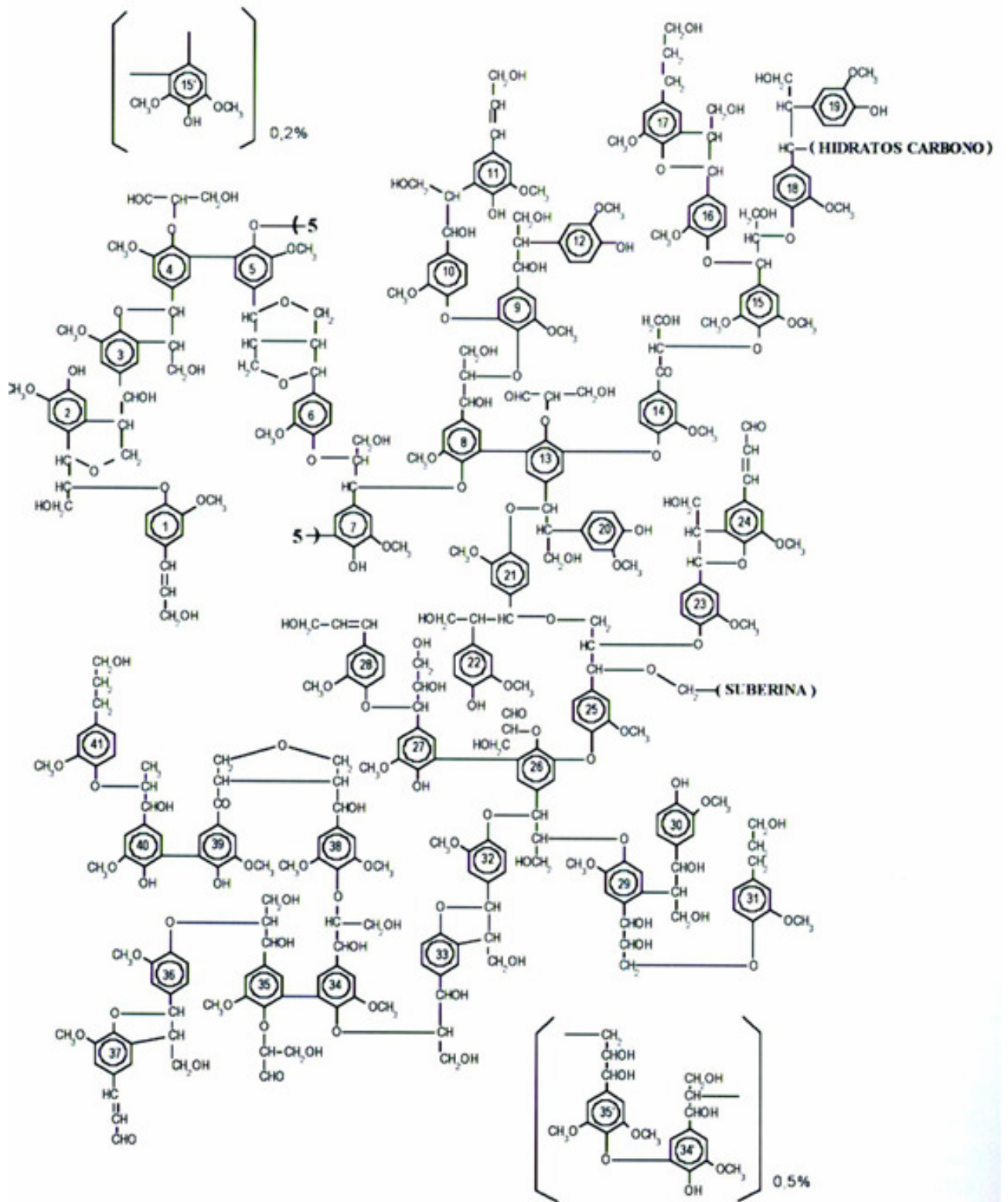


Figura A.7 – Modelo da estrutura da lenhina na cortiça (Fortes *et al*, 2004).

ANEXO B. Determinação das características físicas da cortiça

Com a intenção de melhor se entender o cálculo sequencial das características físicas da cortiça, apresenta-se em seguida a exemplificação do cálculo dessas características para a amostra B4/14:

Após o descortiçamento da árvore B4/14, foi retirada uma rabanada de uma das pranchas removidas do sobreiro, tendo-se determinado o calibre de 31,40mm através da média dos valores de espessura medidos com um paquímetro nos dois extremos e no meio. Com este valor da medição da espessura da prancha, a mesma pertence à classe Meia-marca (27 a 32mm), sendo assim possível brocar rolhas.

Depois de ter sido determinado o calibre de uma rabanada da amostra B4/14, a mesma foi submetida ao processo da cozedura. Após cozedura, a rabanada foi colocada num local arejado e posteriormente foram prensadas. Esta operação tem por finalidade tornar a rabanada plana, facilitando a determinação da porosidade e do número de poros por cm^2 , entre outros, através da análise de imagem. De seguida foi colocada numa estufa a $50\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas para retirar o excesso de água e posteriormente foram estabilizadas a $20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas, tendo-se determinado a humidade de 6,05%.

Depois de se ter determinado a humidade e passou-se à porosidade, a qual foi determinada através da análise de imagem tem do sido obtido o valor de 5,32%, o coloca a mostra B4/14 na classe e cortiças muito porosas. É ainda de referir, que para a realização da análise de imagem foi necessário a obtenção prévia de um provete com cerca de 10cm X 5cm. É possível afirmar, segundo uma perspectiva simplista, que a determinação da porosidade é uma técnica que consiste em determinar cuidadosamente todas as áreas negras perante a área total analisada. Também foi calculado o número de poros por cm^2 , tendo sido obtido o valor de 6,79/ cm^2 .

Da mesma rabanada cozida, também foram brocadas três rolhas para o cálculo da densidade, força e ângulo de torção.

A densidade foi determinada pelo quociente entre a massa do provete (m) e o seu volume ($\pi r^2 H$). A massa foi determinada por pesagem numa balança analítica, obtendo-se obtido para a média dos três valores de 4,09g. Do mesmo modo também se calculou a média os três valores de raio, 11,50mm e de altura 44,31mm. Com estes valores obtém-se a densidade de 222,75 kg/m^3 .

Os ensaios de torção foram realizados para cada uma das três rolhas, resultando uma série de valores de deslocamento e força de torção como se apresentam na tabela B.1. Com os valores do deslocamento e da força de torção, calcula-se o binário correspondente através da equação B.1:

$$Binário_i = \sqrt{12,5 \cdot (Deslocamento_i) \cdot \left(1 - \frac{2 \cdot (Deslocamento_i + 2)}{100}\right)} \cdot Força_i \quad (\text{Eq. B.1})$$

e calcula-se o ângulo de torção através da equação B.2:

$$\hat{Angulo\ de\ torção}_i = ArcCos\left(\frac{(23 - Deslocamento_i) \cdot 2}{2 \cdot 12,5}\right) \cdot 46,15 \quad (\text{Eq. B.2})$$

Tabela B.1 – Valores de deslocamento, força de torção, binário e ângulo de torção para as três rolhas analisadas da amostra B4/14.

Rolha 1				Rolha 2				Rolha 3			
Desl cm	For daN	Binário daN/cm	Ang °	Desl cm	For daN	Binário daN/cm	Ang °	Desl cm	For daN	binário daN/cm	Ang °
0,00	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,00	0,00	0,00	0,0
0,01	0,0	0,00	0,1	0,01	0,2	0,98	0,1	0,01	0,10	0,49	0,1
0,06	0,2	0,99	0,7	0,04	0,4	1,98	0,5	0,03	0,20	0,99	0,3
0,12	0,3	1,51	1,4	0,25	0,5	2,59	2,8	0,12	0,20	1,01	1,4
0,20	0,4	2,05	2,3	0,35	0,6	3,17	3,9	0,23	0,30	1,55	2,6
0,29	0,5	2,61	3,3	0,43	0,7	3,76	4,8	0,32	0,40	2,10	3,6
0,39	0,7	3,73	4,4	0,57	0,7	3,86	6,3	0,37	0,40	2,12	4,2
0,50	0,7	3,81	5,5	0,63	0,8	4,46	6,9	0,47	0,50	2,71	5,2
0,60	0,8	4,44	6,6	0,73	0,8	4,54	7,9	0,56	0,60	3,31	6,2
0,71	0,9	5,09	7,7	0,88	0,8	4,66	9,4	0,65	0,60	3,36	7,1
0,81	1,0	5,76	8,7	0,98	0,9	5,33	10,4	0,83	0,70	4,04	8,9
0,92	1,0	5,86	9,8	1,09	0,9	5,42	11,4	0,94	0,70	4,12	10,0
1,03	1,1	6,56	10,9	1,23	0,9	5,53	12,7	1,05	0,70	4,19	11,0
1,13	1,1	6,66	11,8	1,34	1,0	6,24	13,8	1,15	0,70	4,25	12,0
1,24	1,1	6,77	12,8	1,43	1,0	6,32	14,6	1,26	0,80	4,94	13,0
1,35	1,2	7,50	13,9	1,51	1,0	6,39	15,3	1,36	0,80	5,01	13,9
1,45	1,2	7,60	14,8	1,65	1,1	7,15	16,6	1,43	0,80	5,06	14,6
1,55	1,3	8,35	15,7	1,75	1,1	7,24	17,4	1,55	0,80	5,14	15,7
1,64	1,3	8,44	16,5	1,82	1,1	7,31	18,0	1,66	0,90	5,86	16,6
1,77	1,3	8,58	17,6	1,87	1,1	7,35	18,5	1,73	0,90	5,91	17,3
2,28	1,4	9,79	21,9	2,37	1,2	8,47	22,6	2,27	1,00	6,99	21,8
2,81	1,5	11,06	26,1	2,91	1,3	9,67	26,9	2,78	1,00	7,35	25,9
3,34	1,6	12,35	30,2	3,43	1,3	10,11	30,8	3,31	1,10	8,47	29,9
3,84	1,7	13,65	33,8	3,96	1,4	11,34	34,6	3,85	1,20	9,64	33,9
4,40	1,7	14,20	37,7	4,49	1,4	11,76	38,3	4,37	1,20	10,00	37,5

4,90	1,7	14,66	41,1	5,02	1,4	12,16	41,9	4,93	1,30	11,23	41,3
5,43	1,6	14,23	44,5	5,58	1,4	12,55	45,5	5,44	1,30	11,57	44,6
5,97	1,5	13,73	48,0	6,11	1,4	12,90	48,9	5,98	1,30	11,90	48,0
6,50	1,4	13,15	51,3	6,62	1,4	13,22	52,0	6,54	1,30	12,23	51,5
7,04	1,3	12,51	54,5	7,12	1,3	12,55	55,0	7,05	1,30	12,51	54,6
7,57	1,3	12,79	57,6	7,65	1,2	11,84	58,1	7,58	1,30	12,79	57,7
8,10	1,2	12,04	60,7	8,19	1,1	11,08	61,2	8,11	1,20	12,05	60,7
8,64	1,2	12,28	63,7	8,72	1,1	11,29	64,2	8,65	1,10	11,26	63,8
9,17	1,2	12,50	66,7	9,25	1,2	12,53	67,1	9,18	1,10	11,46	66,7
9,70	1,2	12,70	69,6	9,78	1,1	11,67	70,0	9,72	1,00	10,59	69,7
10,24	1,2	12,90	72,5	10,32	1,1	11,85	72,9	10,25	0,80	8,60	72,5
10,77	1,2	13,08	75,3	10,85	1,0	10,92	75,7	10,78	0,70	7,63	75,3
11,30	1,2	13,26	78,0	11,38	1,0	11,07	78,5	11,32	0,50	5,53	78,1

Após terem sido calculados todos os valores do binário e do ângulo de torção correspondentes à série de valores do deslocamento e da força de torção das três rolhas da árvore B4/14, verificou-se qual dos valores do binário era o maior, ou seja, o binário máximo. Como se pode verificar pela tabela B.1, binário máximo de 14,66, 13,22 e 12,79 daN/cm correspondem às rolhas 1, 2 e 3, respectivamente. Para cada uma das três rolhas da árvore B4/14, calculou-se a força de torção correspondente a esse binário máximo, através de uma interpolação correspondente ao ângulo de torção.

ANEXO C. Análise das características físicas da cortiça por métodos de taxonomia numérica para cada herdade

Herdade Monte Fava:

Na Figura C.1 apresenta-se o fenograma obtido pelo método UPGMA, aplicado à matriz de distâncias. O coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,994, que indica que o fenograma é uma boa representação da respectiva matriz.

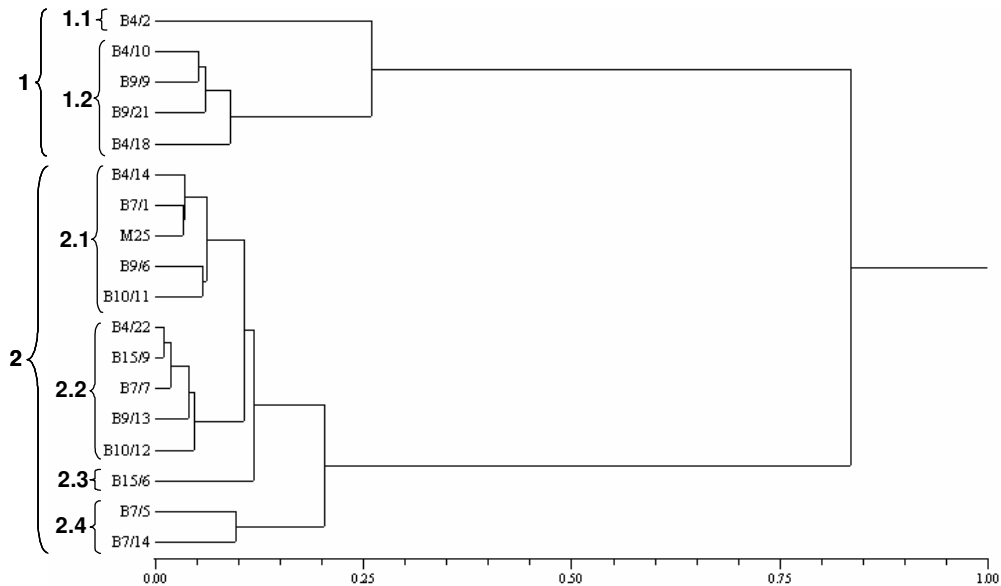


Figura C.1 – Dendrograma da análise das características físicas da cortiça dos sobreiros da herdade Monte Fava, segundo o método UPGMA aplicado à matriz de distâncias (coeficiente de correlação cofenética $r = 0.994$).

Ao analisar o dendrograma, verifica-se que as características físicas da cortiça permitem separar as 18 árvores em 2 agrupamentos distintos. O agrupamento 1 subdividido em 2 subagrupamentos e o agrupamento 2 constituído por 4 subagrupamentos.

Na Figura C.2 apresenta-se a árvore de conexão mínima sobreposta às projecções das 18 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 64,56 para a primeira, 25,38 para a segunda. Na Figura C.3 apresenta-se também a árvore de conexão mínima sobreposta às projecções das 18 árvores no plano definido pela primeira e terceira componentes principais, com os valores da percentagem de variância total explicada por cada um dos eixos coordenados de 64,56 para a primeira e 21,13 para a terceira.

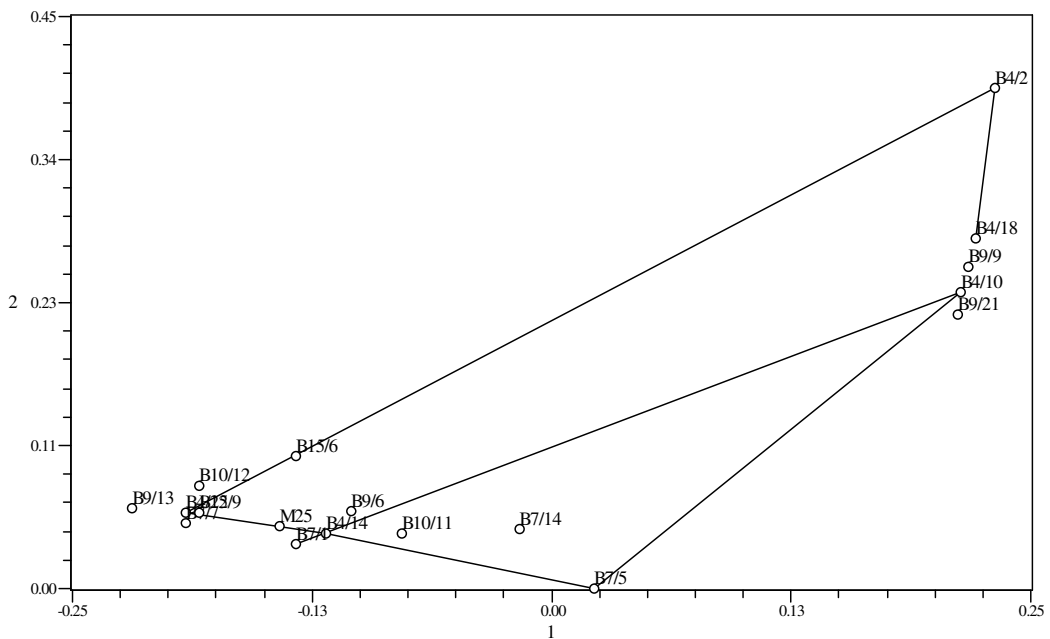


Figura C.2 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 18 árvores no plano definido pela primeira componente principal (64,56%) e pela segunda componente principal (25,38%) com base nas características físicas da cortiça

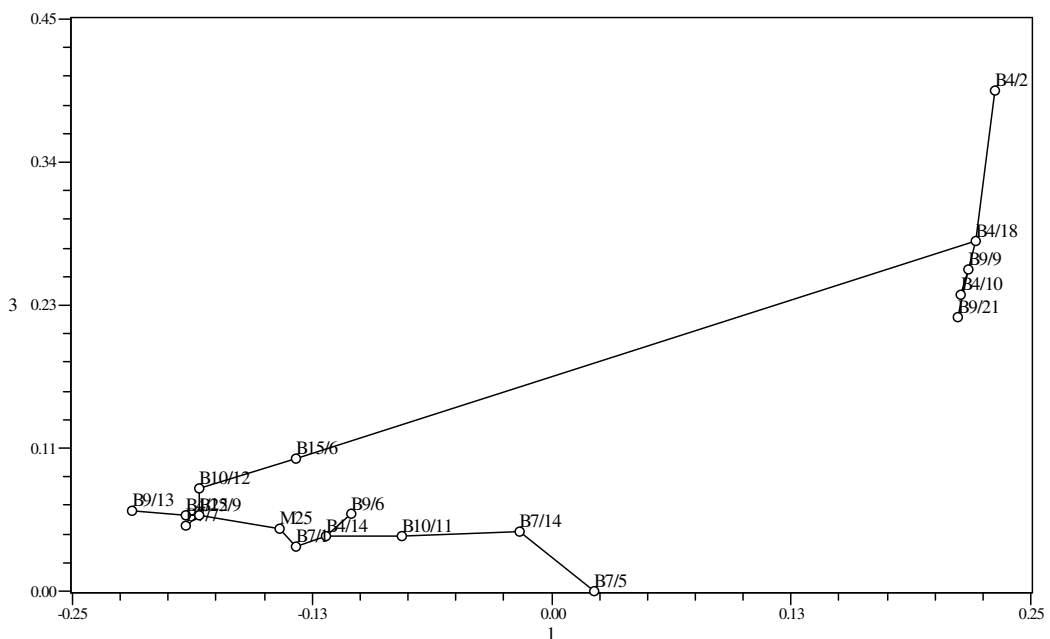


Figura C.3 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 18 árvores no plano definido pela primeira componente principal (64,56%) e pela terceira componente principal (21,13%) com base nas características físicas da cortiça.

Ao sobrepor-se a árvore de conexão mínima, esta permite também detectar dois agrupamentos de árvores e consistentes com os agrupamentos 1, 2 detectados no fenograma.

Relativamente à análise das características físicas da cortiça, na Figura C.4 representam-se as projecções das características físicas da cortiça nas primeira e segunda componentes principais.

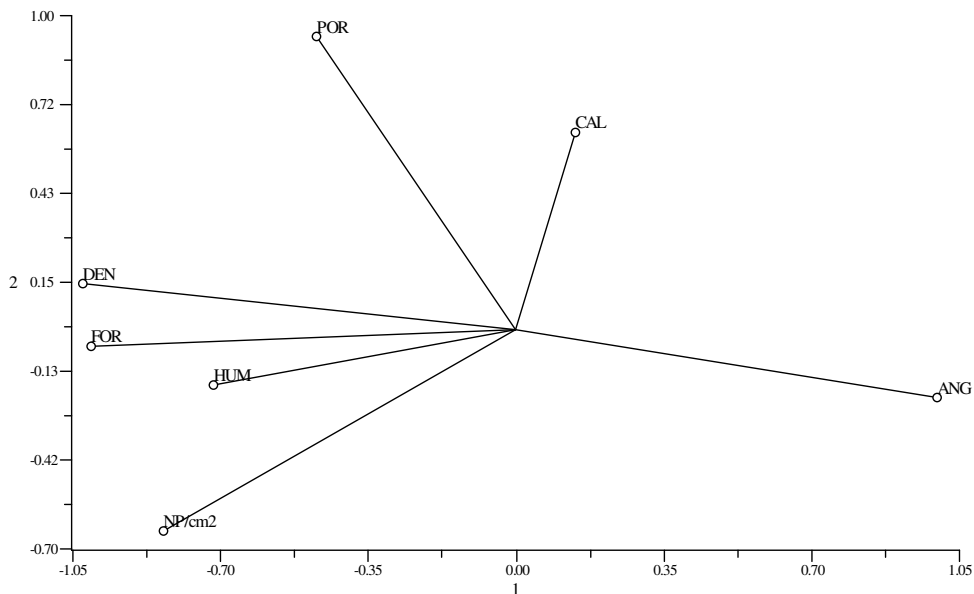


Figura C.4 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das duas primeiras componentes principais.

Sobrepondo as projecções das características físicas da cortiça nas primeira e segunda componentes principais às projecções das árvores com base nas variáveis físicas da cortiça, verifica-se que a primeira componente principal separa as árvores pela força de torção, número de poros por cm^2 , densidade e ângulo de torção. Conclui-se que pela projecção das características às árvores da Herdade do Monte Fava, as mesmas não são fortemente influenciadas por nenhuma característica.

Na Figura C.5 apresentam-se as projecções das características físicas da cortiça nas primeira e terceira componentes principais.

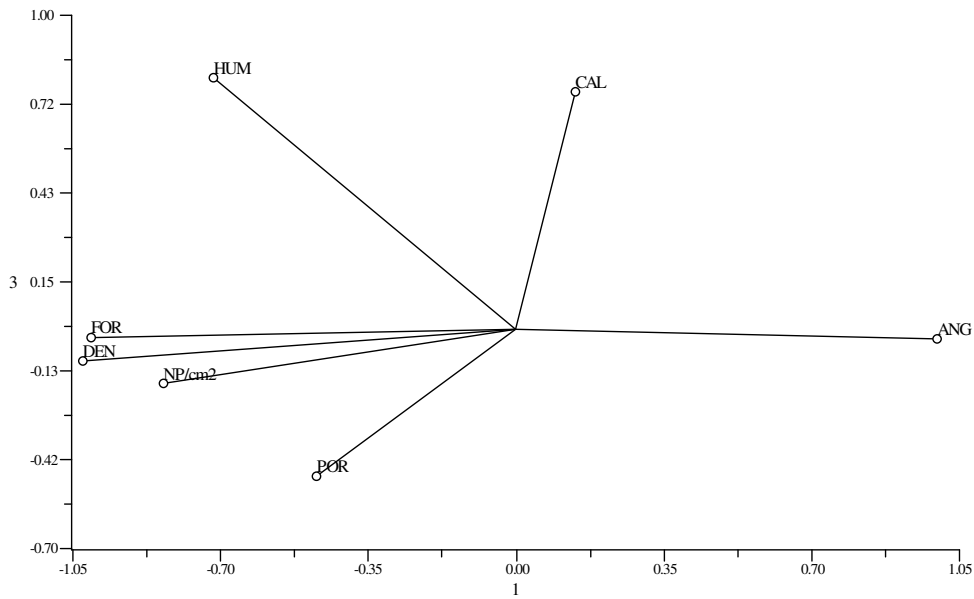


Figura C.5 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das primeira e terceira componentes principais.

Verifica-se que o agrupamento 2 é mais influenciado pela porosidade. Comparando as árvores localizadas na extremidade esquerda da primeira e terceira componentes principais com o fenograma anteriormente obtido para as 18 árvores com base no estudo molecular (Figura 3.5) verifica-se que se distribuem ao longo do fenograma, não estando ligadas entre si.

Herdade de Palma:

O fenograma obtido pelo método UPGMA, aplicado à matriz de distâncias para a Herdade de Palma e mostrado na Figura C.6, apresenta um coeficiente de correlação cofenética (r) de 0,786, o que indica que o fenograma é uma representação aceitável da respectiva matriz.

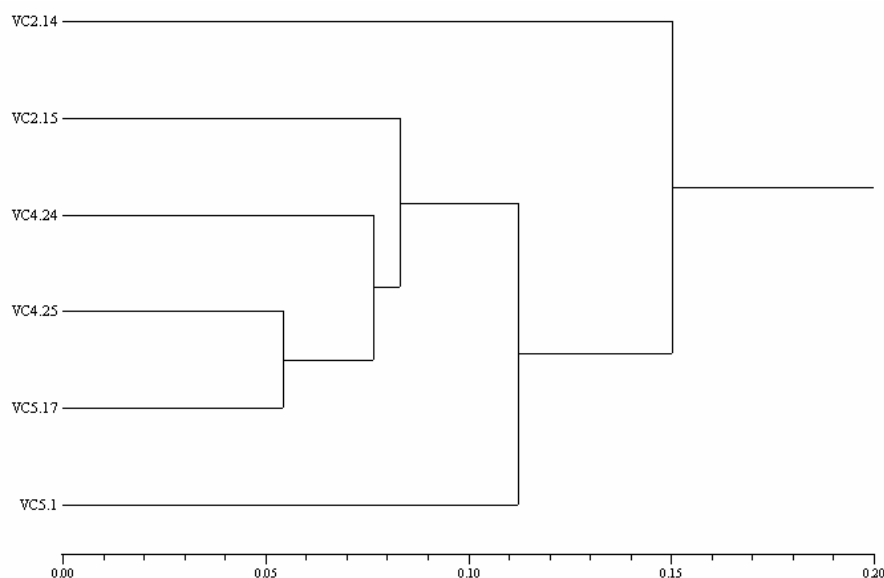


Figura C.6 – Dendrograma da análise das características físicas da cortiça dos sobreiros da herdade de Palma, segundo o método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0.786$).

A análise comparativa deste fenograma com o fenograma obtido para a análise molecular (Figura 3.7) mostra que as árvores VC5.17 e VC4.25, consideradas como produtoras de cortiça de boa qualidade, se encontram ligadas entre si. Embora estes resultados sejam interessantes não permitem estabelecer uma correlação, uma vez que para esta herdade foram analisadas um número reduzido de amostras. Por esta mesma razão e porque as amostras não são fortemente influenciadas pelas características físicas estudadas, não se apresentam as árvores de conexão mínima sobrepostas às projecções dos 6 sobreiros e as projecções das 7 características físicas da cortiça.

Companhia das Lezírias:

Na Figura C.7, apresenta-se o dendograma das 18 amostras estudadas da Companhia das Lezírias obtido pelo método UPGMA, aplicado à matriz de distâncias. O coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,997, que indica que o dendograma é uma boa representação da respectiva matriz.

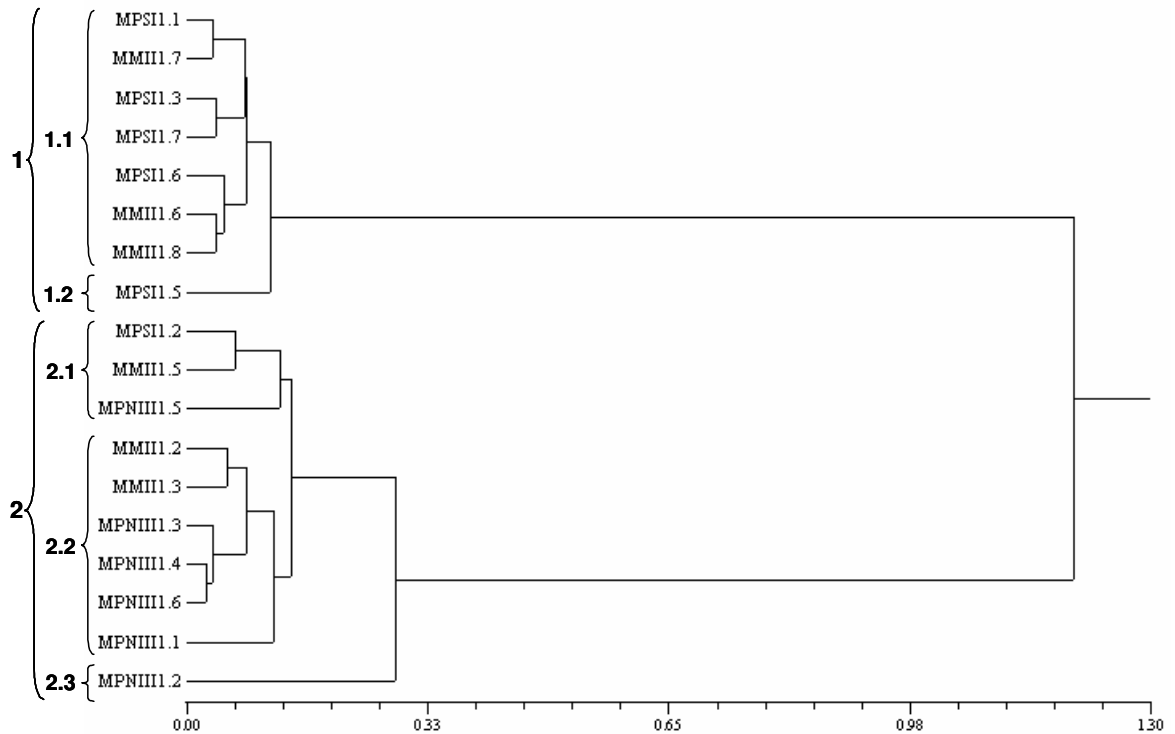


Figura C.7 – Dendograma da análise morfológica da cortiça dos sobreiros da Companhia das Lezírias, segundo o método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0.997$).

Da análise do dendograma da Figura C.7, verifica-se que através das características físicas da cortiça é possível separar as 18 árvores em 2 agrupamentos distintos. O primeiro agrupamento é subdividido em 2 subagrupamentos e o segundo agrupamento é subdividido em 3 subagrupamentos.

Na Figura C.8 apresenta-se a árvore de conexão mínima sobreposta às projecções das 18 árvores no plano definido pela primeira e segunda componentes principais. Os valores da percentagem de variância total explicada por cada um dos eixos coordenados de 69,81 para a primeira, 17,02 para a segunda. Na Figura C.9 apresenta-se também a árvore de conexão mínima sobreposta às projecções das 18 árvores no plano definido pela primeira e terceira componentes principais. Os valores da percentagem de variância total explicada por cada um dos eixos coordenados de 69,81 para a primeira e 9,86 para a terceira.

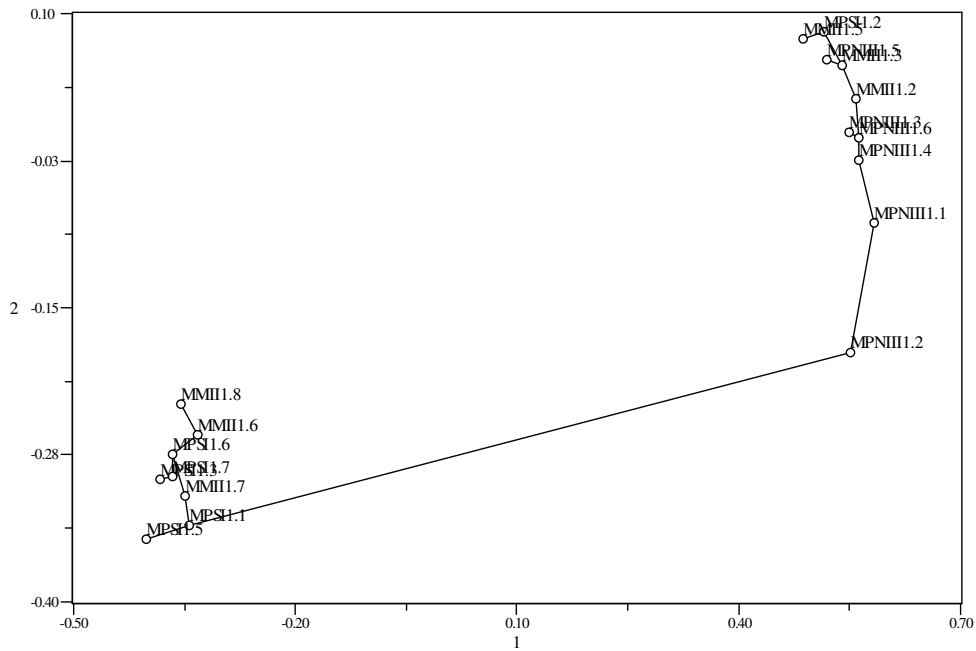


Figura C.8 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 18árvores no plano definido pela primeira componente principal (69,81%) e pela segunda componente principal (17,02%) com base nas características físicas da cortiça.

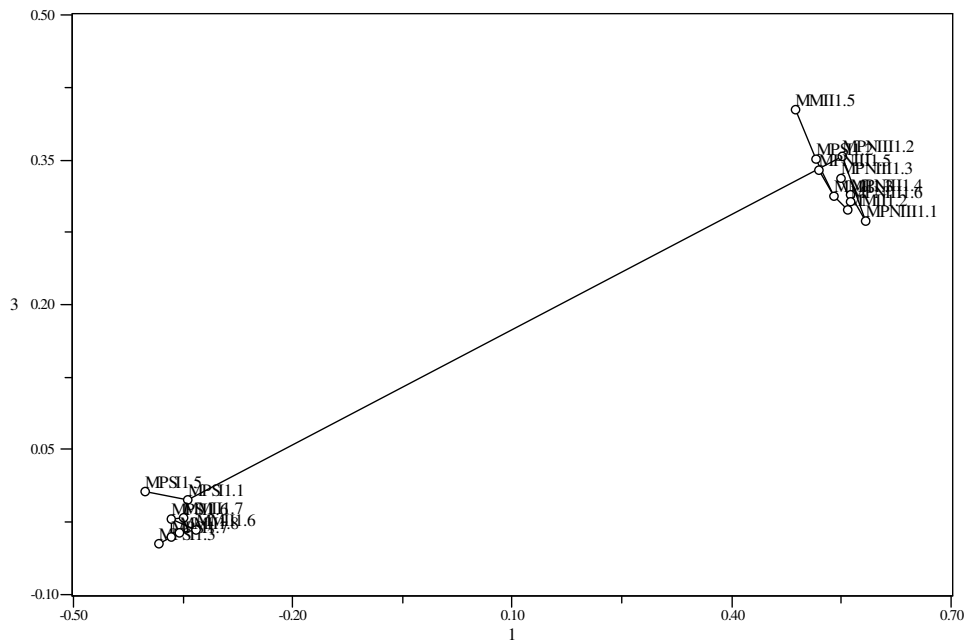


Figura C.9 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 18 árvores no plano definido pela primeira componente principal (69,81%) e pela terceira componente principal (9,86%) com base nas características físicas da cortiça.

Através da análise da sobreposição da árvore de conexão mínima, é possível detectar dois agrupamentos de árvores e consistentes com os agrupamentos 1, 2 detectados no dendograma.

Relativamente à análise das características físicas da cortiça, na Figura C.10 representam-se as projecções das características físicas da cortiça na primeira e na segunda componentes principais.

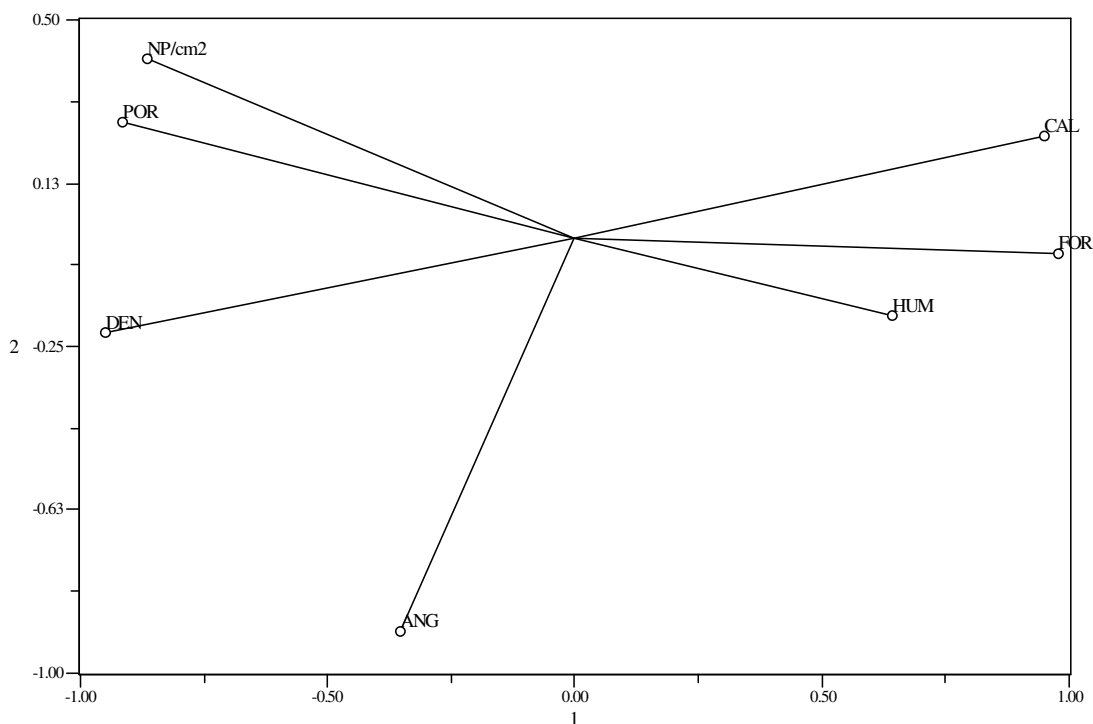


Figura C.10 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das duas primeiras componentes principais.

Sobrepondo as projecções das variáveis físicas da cortiça nas primeira e segunda componentes principais às projecções das árvores com base na físicas da cortiça, verifica-se que o primeiro agrupamento é principalmente influenciado pela densidade e pelo ângulo de torção, enquanto que o segundo agrupamento é mais influenciado pelo calibre, força de torção e humidade.

Na Figura C.11 apresentam-se as projecções das características físicas da cortiça na primeira e na terceira componentes principais.

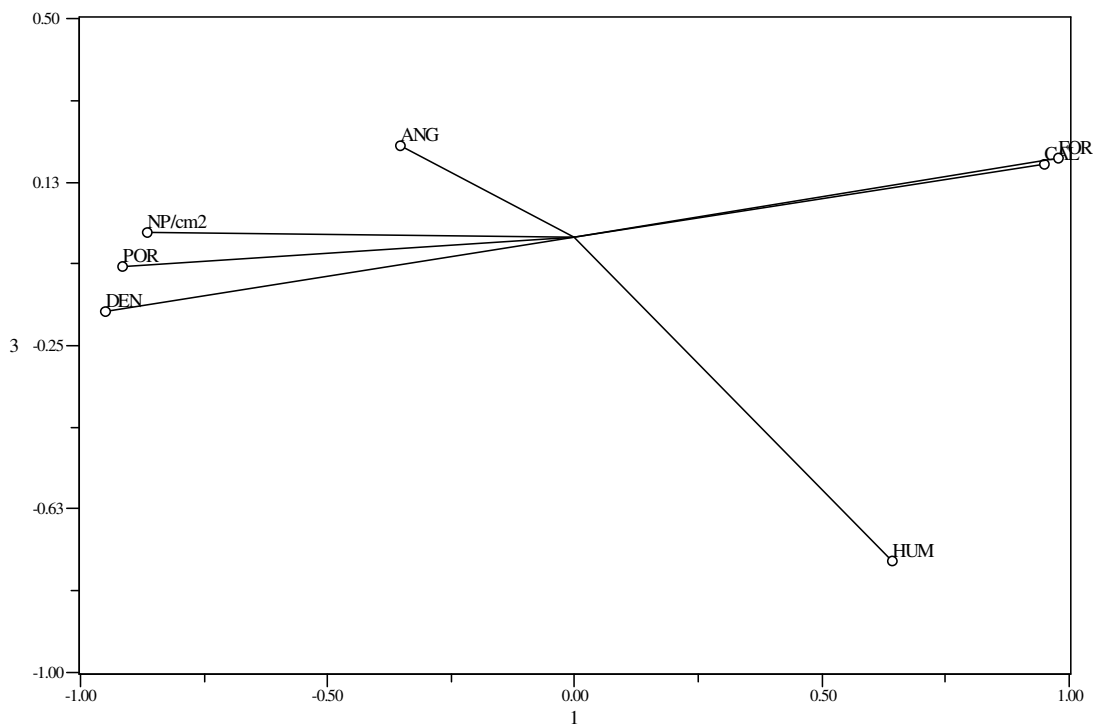


Figura C.11 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das primeira e terceira componentes principais.

Da sobreposição das projecções das características físicas da cortiça verifica-se que o agrupamento 1 é fortemente influenciado pela porosidade, número de poros por cm^2 e densidade, enquanto que o agrupamento 2 é principalmente influenciado pelo calibre e pela força de torção.

Das árvores presentes na tabela 3.15, classificadas como sobreiros produtores de cortiça de boa qualidade, os 3 sobreiros em que se analisaram as 7 características estudadas estão no primeiro agrupamento, enquanto que os restantes sobreiros em que não foi possível realizar os ensaios de torção e medir a densidade, por não terem calibre suficiente para brocar rolhas, ficaram no agrupamento 2.

Ao comparar os 7 sobreiros referidos anteriormente com o fenograma anteriormente obtido para as 18 árvores com base no estudo molecular (Figura 3.9) verifica-se que estes sobreiros distribuem-se ao longo do fenograma, não existindo qualquer relação entre si.

Herdade da Espirra:

Na Figura C.12, apresenta-se o dendograma das 29 amostras estudadas obtido pelo método UPGMA, aplicado à matriz de distâncias. O coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,990, que indica que o dendograma é uma boa representação da respectiva matriz.

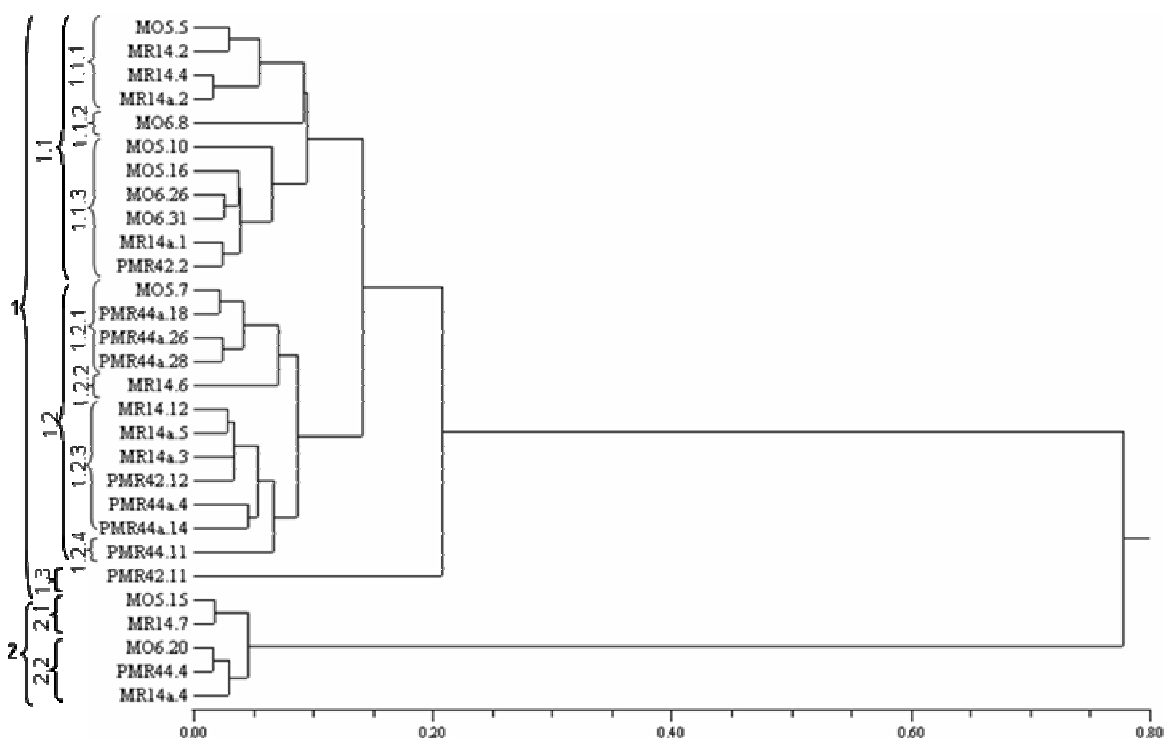


Figura C.12 – Dendograma da análise das características físicas da cortiça dos sobreiros da herdade da Espirra segundo o método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0.990$).

Da análise do dendograma da Figura C.12, verifica-se que através das características morfológicas da cortiça é as 29 árvores em 2 grandes e distintos agrupamentos. O primeiro agrupamento é subdividido em 3 subagrupamentos, os quais ainda se dividem em outros subagrupamentos e o segundo agrupamento é subdividido em 2 subagrupamentos.

Na Figura C.13 apresenta-se a árvore de conexão mínima sobreposta às projecções das 29 árvores no plano definido pela primeira e segunda componentes principais. Os valores da percentagem de variância total explicada por cada um dos eixos coordenados de 59,66 para a primeira, 32,34 para a segunda. Na Figura C.14 apresenta-se também a árvore de conexão mínima sobreposta às projecções das 29

árvores no plano definido pela primeira e terceira componentes principais. Os valores da percentagem de variância total explicada por cada um dos eixos coordenados de 59,66 para a primeira e 13,65 para a terceira.

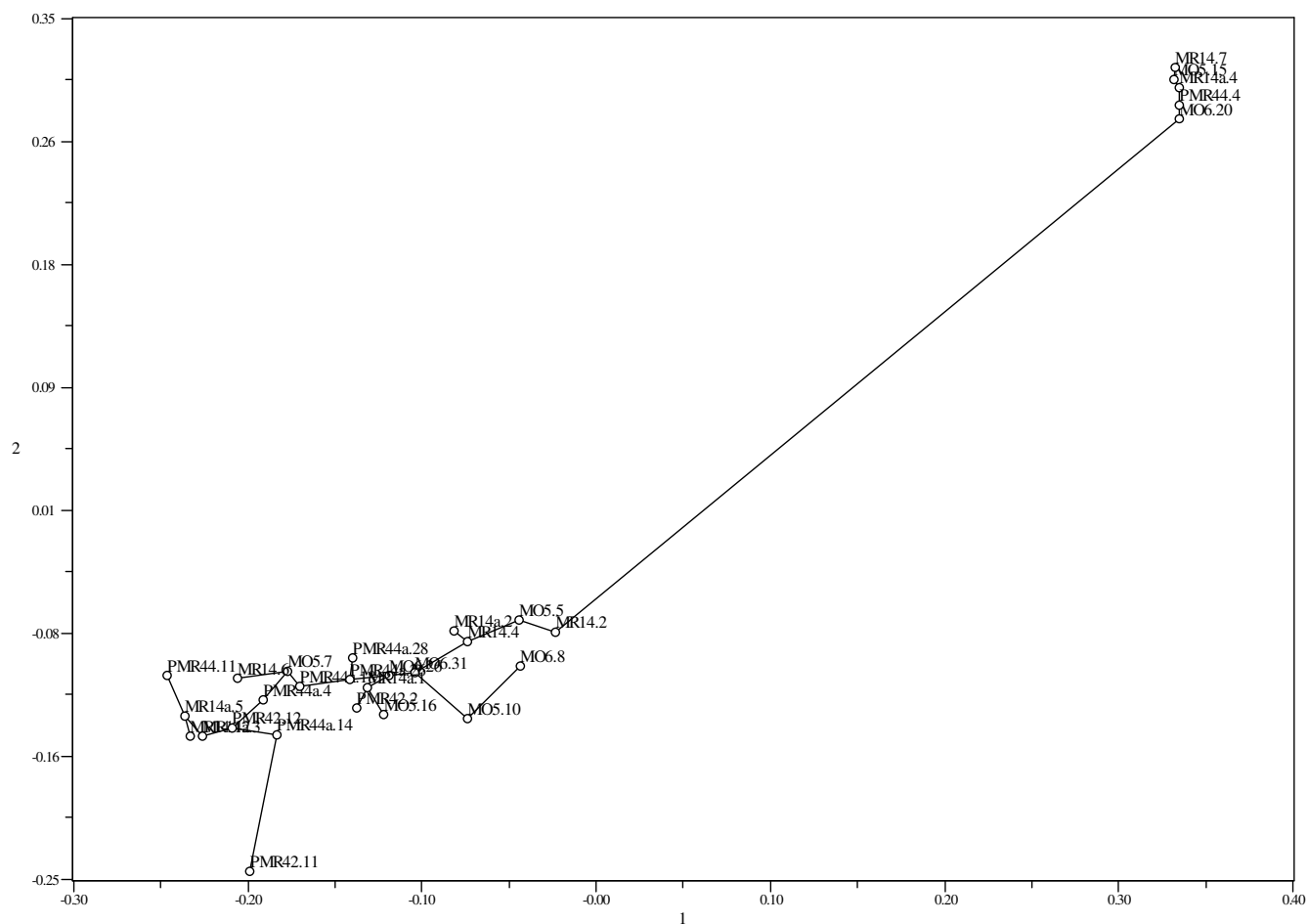


Figura C.13 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 29 árvores no plano definido pela primeira componente principal (59,66%) e pela segunda componente principal (32,34%) com base nas características físicas da cortiça.

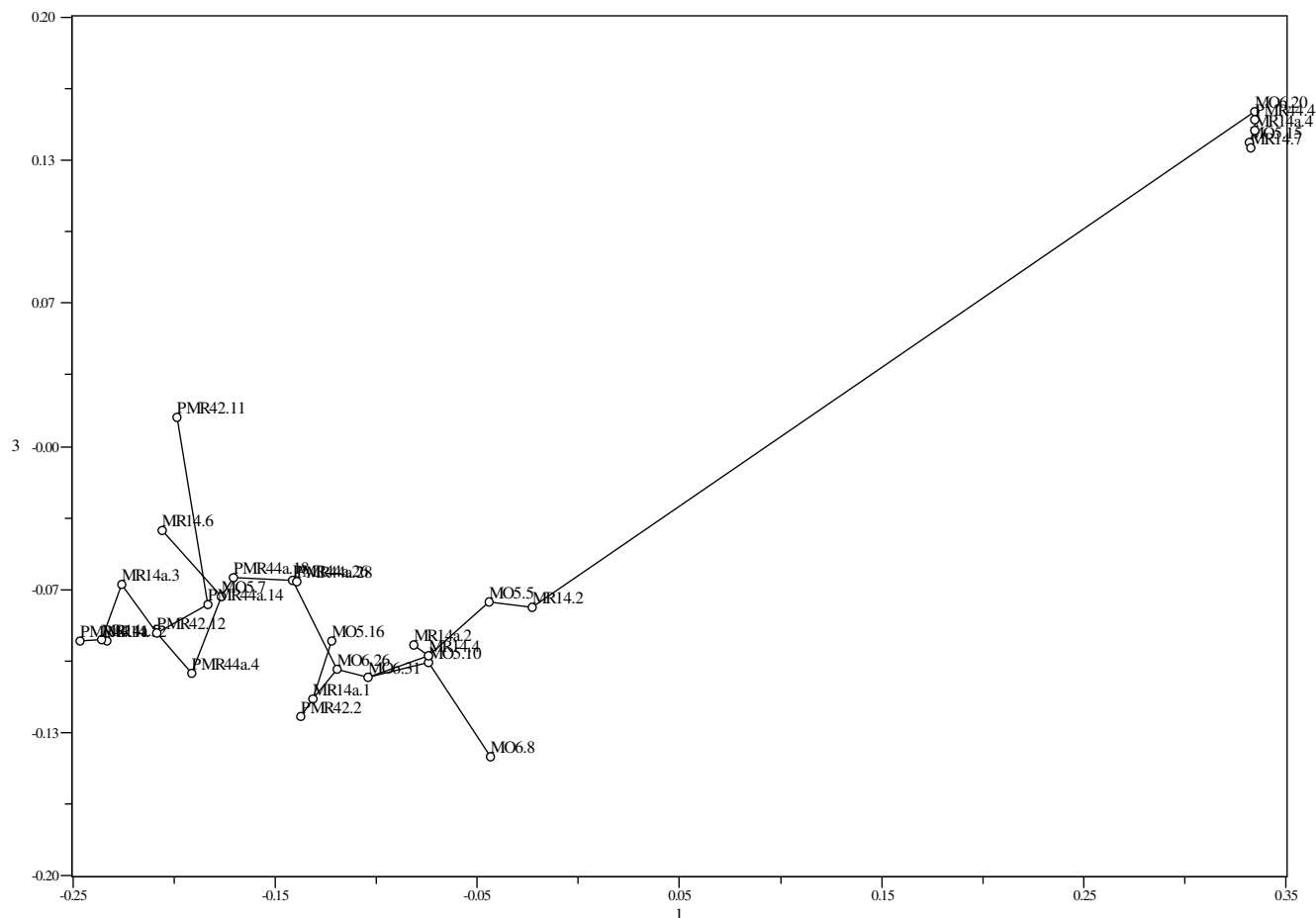


Figura C.14 – Árvore de conexão mínima sobreposta à projecção das 29 árvores no plano definido pela primeira componente principal (59,66%) e pela terceira componente principal (13,65%) com base nas características físicas da cortiça.

Através da análise da sobreposição da árvore de conexão mínima, é possível detectar dois agrupamentos de árvores e consistentes com os agrupamentos 1, 2 detectados no dendograma.

Relativamente à análise das características físicas da cortiça, na Figura C.15 representam-se as projecções das características físicas da cortiça na primeira e na segunda componentes principais.

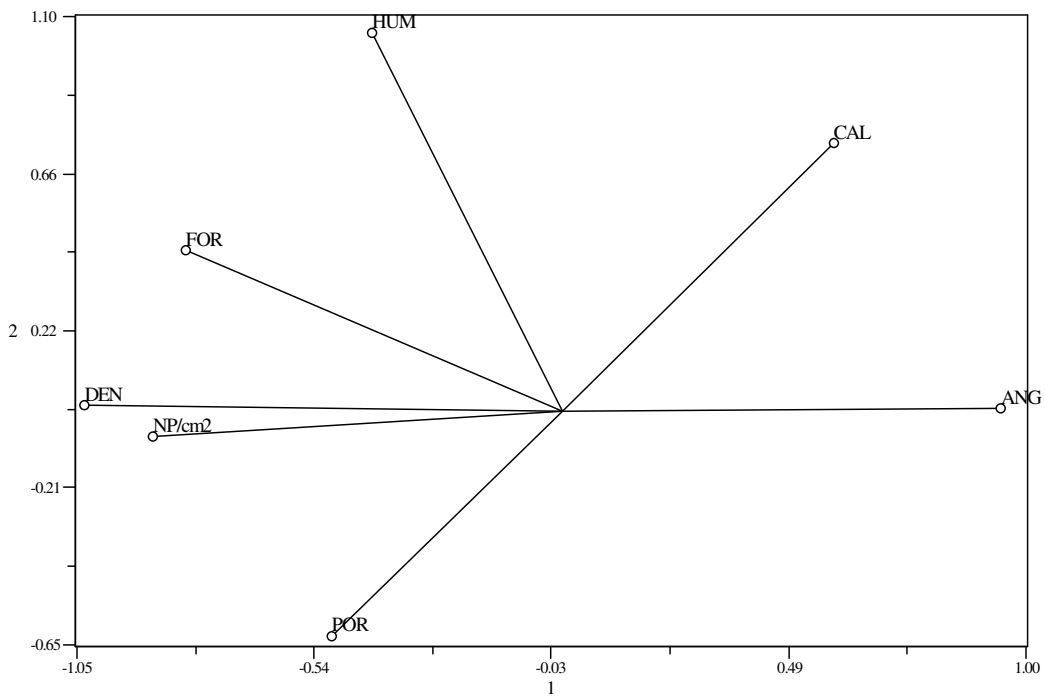


Figura C.15 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das duas primeiras componentes principais.

Sobrepondo as projecções das características físicas da cortiça nas primeira e segunda componentes principais às projecções das árvores com base nas características físicas da cortiça, verifica-se que o primeiro e o segundo agrupamento são influenciados pelas características mais preponderantes na distinção de cortiça de boa qualidade. O primeiro e maior agrupamento é principalmente influenciado pela porosidade mas também é influenciado pelo número de poros por cm^2 e pela densidade, enquanto que o segundo agrupamento é mais influenciado pelo calibre do que pelas restantes características da cortiça.

Na Figura C.16 apresentam-se as projecções das características físicas da cortiça na primeira e na terceira componentes principais.

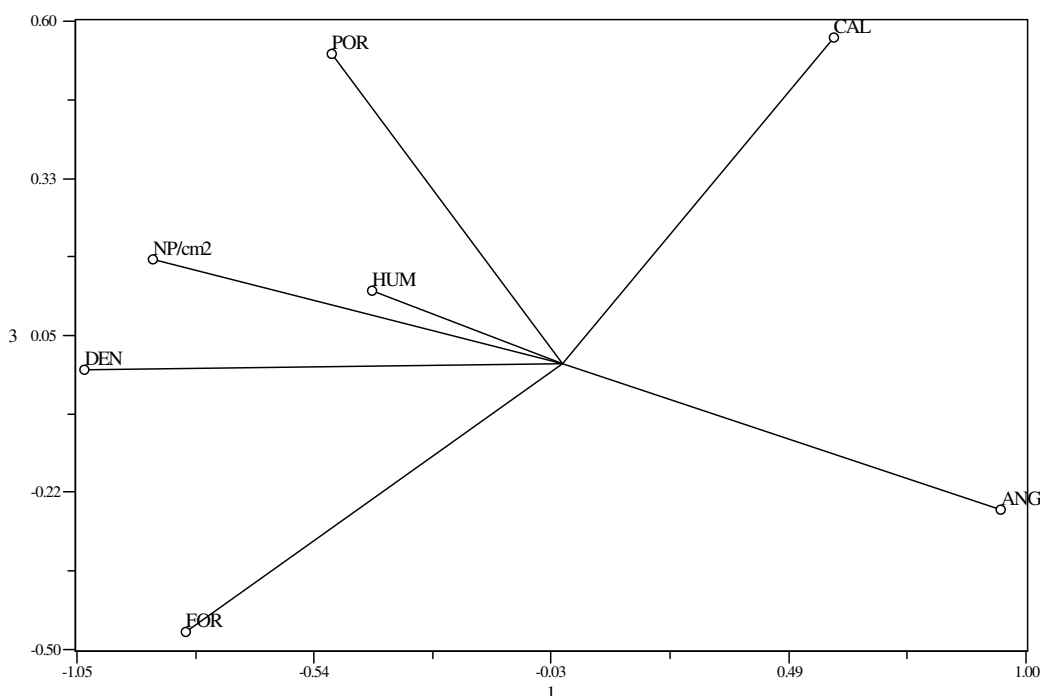


Figura C.16 – Projecções das 7 características físicas da cortiça, no plano das primeira e terceira componentes principais.

Da sobreposição das projecções das características físicas da cortiça verifica-se que o agrupamento 1 mais influenciado força de torção e pela densidade, enquanto, que o agrupamento 2 é ligeiramente influenciado pelo calibre, tal como se verificou para a sobrepondo as projecções das características físicas da cortiça nas primeira e segunda componentes principais.

Das árvores apresentadas na tabela 3.15, classificadas como sobreiros produtores de cortiça de boa qualidade, os sobreiros MO5.15, MO6.20, MR14.7, MR14a.4 e PMR44.4 encontram-se ligados entre si no agrupamento 2. As restantes árvores agruparam-se no subagrupamento 1 do agrupamento 1 (Figura C.12).

Comparando a distribuição destas árvores com base nas características físicas da cortiça com os resultados obtidos no estudo molecular (PAL) (Figura 3.11) verifica-se que estes sobreiros se distribuem ao longo do fenograma, não existindo qualquer relação entre si.

ANEXO D. Matrizes obtidas pelo NTSYSpc

ANEXO D.I. Matriz dos dados moleculares obtida pelo NTSYSpc

Row Labs	Col Labs	Ins. row	Del. row	Close										
Mx. type:	Rectangular	Comments	Matrix:	1										
No. rows:	73	No. cols:	14	Missing:										
Rows\Cols	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13	b14
B4/2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
B4/10	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
B4/14	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B4/18	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
B4/22	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
B7/1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0
B7/2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
B7/5	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
B7/7	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
B7/14	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
B9/6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
B9/9	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
B9/13	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
B9/21	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
B10/11	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
B10/12	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
B15/6	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
B15/9	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
M25	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
VC2.14	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
VC2.15	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
Ve4.24	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
VC4.25	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
VC5.1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
VC5.17	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
MF811.1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
MF811.2	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
MF811.3	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
MF811.5	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
MF811.6	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
MF811.7	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1

Tabela D.1 – Primeira parte da matriz dos dados moleculares obtida pelo NTSYSpc.

Rows\Cols	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13	b14
MMII.2	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
MMII.3	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
MMII.5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
MMII.6	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
MMII.7	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1
MMII.8	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
MPNIII.1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
MPNIII.2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
MPNIII.3	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
MPNIII.4	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MPNIII.5	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
MPNIII.6	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
MO5.5	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
MO5.7	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
MO5.10	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
MO5.15	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
MO5.16	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
MO6.8	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
MO6.20	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
MO6.26	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
MO6.31	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
MR14.2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
MR14.6	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
MR14.7	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
MR14.12	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
MR14a.1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
MR14a.2	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
MR14a.3	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
MR14a.4	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
MR14a.5	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
PHR42.1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
PHR42.2	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
PHR42.4	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
PHR42.11	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
PHR42.12	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
PHR44a.4	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
PHR44a.14	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
PHR44a.18	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
PHR44a.26	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
PHR44a.28	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
PHR44.4	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
PHR44.11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0

Tabela D.2 – Segunda parte da matriz dos dados moleculares obtida pelo NTSYSpc.

ANEXO D.II. Matriz das características físicas obtida pelo NTSYSpc

Row\Cols	CAL	DEN	FOR	ANG	HUM	POR	NP/cm2
B4/2	26	9	9	9	4.7	9.7029423	2.9296339
B4/10	17	9	9	9	4.5	2.4769437	2.3823397
B4/14	31.396666	222.75230	1.4163566	50.249914	6.05	5.3183748	6.7928876
B4/18	26	9	9	9	4.45	4.6636965	3.2837655
B4/22	32	290.28122	1.1881417	35.294289	4.55	4.1065375	4.7002919
B7/1	26.976666	244.73124	1.4498372	50.190138	7.5	0.6720908	1.2233636
B7/5	25.92	168.57165	1.5246830	70.270407	7	0.6812458	1.1267823
B7/7	26.04	265.28542	1.0237956	32.555997	5.9	1.0461304	1.4809138
B7/14	39.526666	188.99965	1.1654611	64.460729	7.1	3.7028909	3.5091220
B9/6	25.383333	197.55778	1.2231261	49.725047	6.9	12.475947	4.7968732
B9/9	23	9	9	9	4.8	3.3753765	2.7686650
B9/13	31.153333	316.15878	0.9534521	25.625689	5.5	2.9896483	3.2515717
B9/21	19	9	9	9	4.6	2.8271933	3.6057033
B10/11	30	198.27077	1.2818729	54.026088	5.3	3.9464896	3.0262153
B10/12	39	252.75126	1.2154146	29.949618	4.6	5.4717141	5.2153923
B15/6	40	172.64886	0.7158900	28.074171	4.8	4.0447389	2.9940215
B15/9	30	255.89697	1.4824657	32.993240	4.9	3.0880769	3.2193780
M25	29.543333	223.19873	0.9668998	41.522354	5.5	1.9663416	2.9940215
VC2.14	32.466666	162.24619	0.8993636	59.461835	5	4.8433948	4.2495789
VC2.15	37	209.64509	0.7495881	53.928785	5.5	3.3028523	4.0886100
VC4.24	32	230.74022	0.8833250	41.704789	5.3	8.0220934	4.9578421
VC4.25	42.133333	214.46863	0.6485301	38.484184	5.7	7.9852035	5.9880431
VC5.1	45.566666	161.04174	0.9479505	43.021692	5.6	1.5084456	2.8008588
VC5.17	45.1	187.20331	0.6164613	41.112685	6.1	7.0378162	3.9920287
HPSI1.1	34.07	159.86829	1.2647970	49.175869	5.4	0.8940724	1.8672392
HPSI1.2	26.56	9	9	9	5.7	3.3904583	5.1188110
HPSI1.3	26.101666	217.73816	0.9826872	50.061396	5.35	1.6783412	2.9618277
HPSI1.5	31.503333	159.58836	0.7996747	55.664845	5.6	13.025435	5.0222297
HPSI1.6	36.963333	180.13399	0.8655095	44.648381	5.6	6.6508106	5.5373301
HPSI1.7	27.036666	165.97890	0.8466022	40.050099	5.6	2.1832253	2.3823397
HMII1.2	27.273333	9	9	9	6.5	2.4321860	2.9296339
HMII1.3	26.24	9	9	9	6.5	4.0739364	3.6378971
HMII1.5	21.886666	9	9	9	5.4	4.7587628	5.7948804
HMII1.6	37.423333	163.92251	1.0313619	35.955395	6.55	2.3792732	2.7364713
HMII1.7	31.1	152.23043	0.8161067	42.028519	6	1.6445397	2.5755024
HMII1.8	36.583333	163.89421	0.5934656	33.329758	5.55	7.7193830	4.4749354
HPNIII1.1	24.153333	9	9	9	6	0.4592581	0.9336196
HPNIII1.2	16.793333	9	9	9	5.1	1.9779494	2.0925957
HPNIII1.3	24.936666	9	9	9	5.6	1.9669105	3.0262153
HPNIII1.4	26.316666	9	9	9	5.5	1.0199053	1.5774952
HPNIII1.5	24.32	9	9	9	6.1	5.3817064	3.7666722
HPNIII1.6	23.293333	9	9	9	6.5	2.8614202	3.4447344

Tabela D.3 – Primeira parte da matriz das características físicas obtida pelo NTSYSpc.

Rows\Cols	CAL	DEN	FOR	ANG	HUM	POR	NP/cm2
MO5.5	44.633333	144.00419	1.0989038	45.127519	6	2.5350869	2.1891770
MO5.7	34.34	164.75947	0.8644173	31.122889	5	4.5536699	5.2476494
MO5.10	35.683333	154.89838	1.1329972	52.080785	4.9	9.5894457	4.0242225
MO5.15	26.506666	9	9	9	5.3	1.3613816	2.5111148
MO5.16	29.966666	142.91104	0.6326859	40.065559	5	7.9565879	5.1869829
MO6.8	33.42	148.09919	1.5978727	54.451960	4.7	0.3120288	0.9658134
MO6.20	38.086666	9	9	9	5.9	2.6455306	2.4145335
MO6.26	36.003333	168.18947	1.2509279	45.250992	4.9	3.1662806	4.1253197
MO6.31	32.146666	149.06244	1.0497005	43.241390	6.5	3.8970313	2.5433086
MR14.2	47.976666	149.93552	1.0503225	51.711516	6.1	3.6116889	3.8523206
MR14.4	44.236666	170.57383	1.2158641	51.051664	5.6	1.2727852	2.3179521
MR14.6	39.023333	182.50117	0.6495766	25.756612	4.8	8.5819867	5.3993156
MR14.7	18.74	9	9	9	4.1	0.9904973	1.8028516
MR14.12	28.386666	231.50892	0.6326240	36.824296	4.4	11.542694	5.7633144
MR14a.1	32.426666	174.84000	1.1967304	46.236818	4.7	3.0659952	2.6076961
MR14a.2	38.89	148.25165	1.1823523	42.587944	6.1	0.9213940	2.1247894
MR14a.3	33.926666	210.04035	0.9636376	34.261593	5.2	13.971196	10.434632
MR14a.4	23.983333	9	9	9	4.4	1.2152189	1.4487201
MR14a.5	28.34	209.91747	1.0829248	32.521743	5.2	7.3284483	8.9786371
PMR42.2	29.053333	171.86761	1.3502609	47.265657	4.9	4.4207327	4.5803182
PMR42.11	38.833333	193.22758	1.4501279	42.136980	6.7	44.244787	11.435629
PMR42.12	30.43	196.99134	1.3472701	36.974934	4.8	9.9172975	8.3113060
PMR44a.4	31.133333	206.89256	0.8327868	40.701247	4.6	4.2969202	3.9598349
PMR44a.14	34.543333	196.32208	0.7160983	40.828474	4.8	13.793947	5.7633144
PMR44a.18	35	158.39657	0.8825164	32.722493	5.6	6.9081658	8.7056380
PMR44a.26	40.36	171.52280	1.0654907	39.575442	6.6	8.4837686	5.5509817
PMR44a.28	36.903333	151.16478	0.5972653	33.392584	5.1	4.2320624	4.7623176
PMR44.4	30.396666	9	9	9	5	1.7861099	1.7706579
PMR44.11	30.243333	226.11660	1.5655104	25.787155	5	1.8092682	2.4145335

Tabela D.4 – Segunda parte da matriz das características físicas obtida pelo NTSYSpc.

Anexo E. Protocolos

Anexo E.I. Protocolo DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

Protocol: Isolation of Total DNA from Plant Tissue Using the DNeasy Plant Mini Kit

Important points before starting

- If using the DNeasy Plant Mini Kit for the first time please read "Important Notes" (page 12).
- Buffer AP1 may develop a yellow color upon storage. This does not affect the procedure.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C) in a micro-centrifuge.

Things to do before starting

- Buffers AP1 and AP3/E concentrate may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 65°C to redissolve (before adding ethanol to Buffer AP3/E). Do not heat Buffer AP3/E after ethanol has been added.
- Buffers AW and AP3/E are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.

Manual disruption

Grind plant or fungal tissue under liquid nitrogen to a fine powder using a mortar and pestle. Transfer the tissue powder and liquid nitrogen to an appropriately sized tube and allow the liquid nitrogen to evaporate. Do not allow the sample to thaw. Proceed immediately to the DNA preparation protocol.

Note: See "Disruption of plant tissue" (page 9).

Disruption using the TissueLyser

Disruption of frozen tissue*

1. Place the sample material (≤ 100 mg wet weight) into a 2 ml Safe-Lock microtube, together with a 5 mm stainless steel bead.
2. Freeze the tubes in liquid nitrogen for 30 s.
3. Place the tubes into the TissueLyser Adapter Set and fix into the clamps of the TissueLyser. Immediately grind the samples for 1 min at 30 Hz.
4. Disassemble the Adaptor Set, remove the microtubes, and re-freeze the samples in liquid nitrogen for 30 s.

* To enable optimum disruption and reduce DNA shearing, fresh tissue should be frozen in liquid nitrogen and processed using the "Disruption of frozen tissue" protocol.

5. Repeat step 3, reversing the position of the microtubes within the Adaptor Set.

To prevent variation in sample homogenization, the Adaptor Sets should be removed from the TissueLyser and disassembled after the first disruption step. For the second disruption step, the Adaptor Sets should be reassembled so that the microtube order is reversed. Rotating the racks of collection microtubes in this way ensures that all samples are thoroughly and equally disrupted.

Note: The majority of plant tissue is ground to a fine powder after two disruption steps, however, for some materials one disruption step may be sufficient. Other tissues, like seeds and roots, may need three disruption steps. Optimisation of the disruption procedure may be required for some plant material.

Disruption of lyophilised tissue

Ensure that the material is dry otherwise grinding can lead to clumps.

- 1. Place the sample material (≤ 20 mg dry weight) into a 2 ml Safe-Lock microtube, together with a 5 mm stainless steel bead.**
- 2. Place the tubes into the TissueLyser Adaptor Set and fix into the clamps of the TissueLyser. Immediately grind the samples for 1 min at 30 Hz.**
- 3. Disassemble the Adaptor Set, and reverse the positions of the microtubes. Grind the samples for 1 min at 30 Hz.**

To prevent variation in sample homogenization, the Adaptor Sets should be removed from the TissueLyser and disassembled after the first disruption step. For the second disruption step, the Adaptor Sets should be reassembled so that the microtube order is reversed. Rotating the racks of collection microtubes in this way ensures that all samples are thoroughly and equally disrupted.

DNA Preparation

- 1. Add 400 μ l of Buffer AP1 and 4 μ l of RNase A stock solution (100 mg/ml) to a maximum of 100 mg of ground (wet weight) or 20 mg (dried) plant or fungal tissue and vortex vigorously.**

No tissue clumps should be visible. Vortex or pipet further to remove any clumps. Clumped tissue will not lyse properly and will therefore result in a lower yield of DNA. In the rare case where clumps cannot be removed by pipetting and vortexing, a disposable micropestle may be used.

Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.

- 2. Incubate the mixture for 10 min at 65°C. Mix 2–3 times during incubation by inverting tube.**

This step lyses the cells.

3. **Add 130 μ l of Buffer AP2 to the lysate, mix, and incubate for 5 min on ice.**
This step precipitates detergent, proteins, and polysaccharides.
Optional: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 \times g (14,000 rpm).
Some plant materials can generate very viscous lysates and large amounts of precipitates during this step resulting in shearing of the DNA in the next step (see "Lysate filtration with QIAshredder", page 13). In this case, optimal results are obtained if the majority of these precipitates are removed by centrifugation for 5 min at 20,000 \times g (14,000 rpm). After centrifugation, apply supernatant to QIAshredder Mini Spin Column and continue with step 4.
4. **Apply the lysate to the QIAshredder Mini Spin Column (lilac) placed in a 2 ml collection tube and centrifuge for 2 min at 20,000 \times g (14,000 rpm).**
It may be necessary to cut the end off the pipet tip to apply the lysate to the QIAshredder Mini Column. The QIAshredder Mini Column removes most precipitates and cell debris, but a small amount will pass through and form a pellet in the collection tube. Be careful not to disturb this pellet in step 5.
5. **Transfer flow-through fraction from step 4 to a new tube (not supplied) without disturbing the cell-debris pellet.**
Typically 450 μ l of lysate is recovered. For some plant species less lysate is recovered. In this case determine volume for the next step.
6. **Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E to the cleared lysate and mix by pipetting.**
Example: To 450 μ l lysate add 675 μ l Buffer AP3/E. Reduce the amount of Buffer AP3/E accordingly if less lysate is recovered. A precipitate may form after the addition of ethanol but this will not affect the DNeasy procedure.
Note: Ensure ethanol has been added to Buffer AP3/E (see "Things to do before starting").
Note: It is important to pipet Buffer AP3/E directly onto the cleared lysate and to mix immediately.
7. **Apply 650 μ l of the mixture from step 6, including any precipitate which may have formed, to the DNeasy Mini Spin Column sitting in a 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge for 1 min at \geq 6000 \times g (corresponds to \geq 8000 rpm for most micro-centrifuges) and discard flow-through.***
Reuse the collection tube in step 8.
8. **Repeat step 7 with remaining sample. Discard flow-through* and collection tube.**
9. **Place DNeasy Mini Spin Column in a new 2 ml collection tube (supplied), add 500 μ l Buffer AW to the DNeasy Mini Spin Column and centrifuge for 1 min at \geq 6000 \times g (\geq 8000 rpm). Discard flow-through and reuse the collection tube in step 10.**
Note: Ensure ethanol is added to Buffer AW.

* Flow-through fractions contain Buffer AP3/E, and are therefore not compatible with bleach. See page 6 for further information.

-
- 10. Add 500 μ l Buffer AW to the DNeasy Mini Spin Column and centrifuge for 2 min at 20,000 \times g (14,000 rpm) to dry the membrane.**

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini Spin Column since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This spin ensures that no residual ethanol will be carried over during elution. Discard flow-through and collection tube.

After washing with Buffer AW, the DNeasy Mini Spin Column membrane is usually only slightly colored. In the rare case that the membrane remains significantly colored after washing with Buffer AW, refer to "Darkly colored membrane" in the Troubleshooting Guide on page 26.

Note: Following the spin, remove the DNeasy Mini Spin Column from the collection tube carefully so the column does not come into contact with the flow-through, as this will result in carryover of ethanol.

- 11. Transfer the DNeasy Mini Spin Column to a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied) and pipet 100 μ l of Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C) and then centrifuge for 1 min at \geq 6000 \times g (\geq 8000 rpm) to elute.**

Elution with 50 μ l (instead of 100 μ l) increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but also reduces overall DNA yield. If larger amounts of DNA (>20 μ g) are loaded, eluting with 200 μ l (instead of 100 μ l) increases yield. See "Elution" on page 13.

- 12. Repeat step 11 once.**

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, the microcentrifuge tube can be reused for the second elution step to combine the eluates.

Note: More than 200 μ l should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini Spin Column will come into contact with the eluate.

Anexo E.II. Protocolo *Taq* PCR (QIAGEN)

PCR Protocol Using *Taq* PCR Master Mix

This protocol serves as a guideline for PCR amplification. Optimal reaction conditions, such as incubation times, temperatures, and amount of template DNA, may vary and must be individually determined.

Important notes before starting

- *Taq* PCR Master Mix provides a final concentration of 1.5 mM MgCl₂ which will produce satisfactory results in most cases. However, if a higher Mg²⁺ concentration is required, prepare a stock solution containing 25 mM MgCl₂.
- Set up reaction mixtures in an area separate from that used for DNA preparation or PCR product analysis.
- Use disposable tips containing hydrophobic filters to minimize cross-contamination.

Protocol

1. Thaw primer solutions.

Keep on ice after complete thawing, and mix well before use.

Optional: Prepare a primer mix of an appropriate concentration (see Table 6, page 19) using the water provided.

This is recommended if several amplification reactions using the same primer pair are to be performed. The final volume of diluted primer mix plus the template DNA, added at step 4, should be 50 µl per reaction.

2. Mix the *Taq* PCR Master Mix by vortexing briefly, and dispense 50 µl into each PCR tube according to Table 6, page 19.

It is important to mix the *Taq* PCR Master Mix before use to avoid localized differences in salt concentration. *Taq* PCR Master Mix is provided as a 2x concentrate (i.e., a 50-µl volume of the *Taq* PCR Master Mix is required for amplification reactions with a final volume of 100 µl). For volumes smaller than 100 µl, the 1/1 ratio of *Taq* PCR Master Mix to diluted primer mix and template should be maintained as defined in Table 6. A negative control (without template DNA) should be included in every experiment. It is recommended that the PCR tubes are kept on ice until they are placed in the thermal cycler.

3. Distribute the appropriate volume of diluted primer mix into the PCR tubes containing the Master Mix.

4. Add template DNA (≤1 µg/reaction) to the individual PCR tubes.

For RT-PCR, add an aliquot from the reverse transcriptase reaction. The volume added should not exceed 10% of the final PCR volume (see appendix, page 29).

Table 6. Reaction composition using Taq PCR Master Mix

Component	Volume/reaction	Final concentration
Taq PCR Master Mix	50 µl	2.5 units Taq DNA Polymerase 1x QIAGEN PCR Buffer* 200 µM of each dNTP
Diluted primer mix		
Primer A	Variable	0.1–0.5 µM
Primer B	Variable	0.1–0.5 µM
Distilled water (provided)	Variable	–
Template DNA		
Template DNA, added at step 4	Variable	≤1 µg/reaction
Total volume	100 µl	–

* Contains 1.5 mM MgCl₂

5. When using a thermal cycler with a heated lid, do not use mineral oil. Proceed directly to step 6. Otherwise, overlay with approximately 100 µl mineral oil.
6. Program the thermal cycler according to the manufacturer's instructions.
A typical PCR cycling program is outlined in Table 7, page 20. For maximum yield and specificity, temperatures and cycling times should be optimized for each new target or primer pair.
7. For a simplified hot start, proceed as described in step 7a. Otherwise, place the PCR tubes in the thermal cycler and start the cycling program.
- 7a. **Simplified hot start:** Start the PCR program. Once the thermal cycler has reached 94°C, place the PCR tubes in the thermal cycler.
In many cases, this simplified hot start improves the specificity of the PCR. For information on a highly specific and convenient hotstart procedure using HotStarTaq™ Master Mix Kit, see appendix, page 32.
Note: After amplification, samples can be stored overnight at 2–8°C, or at –20°C for longer term storage.

QIAquick PCR Purification Kit Protocol

using a microcentrifuge

This protocol is designed to purify single- or double-stranded DNA fragments from PCR and other enzymatic reactions (see page 8). For cleanup of other enzymatic reactions, follow the protocol as described for PCR samples or use the new MinElute Reaction Cleanup Kit. Fragments ranging from 100 bp to 10 kb are purified from primers, nucleotides, polymerases, and salts using QIAquick spin columns in a microcentrifuge.

Notes:

- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- All centrifuge steps are at 13,000 rpm (~17,900 $\times g$) in a conventional tabletop microcentrifuge.

1. **Add 5 volumes of Buffer PB to 1 volume of the PCR sample and mix. It is not necessary to remove mineral oil or kerosene.**

For example, add 500 μ l of Buffer PB to 100 μ l PCR sample (not including oil).

2. **Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.**
3. **To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.**
4. **Discard flow-through. Place the QIAquick column back into the same tube.**

Collection tubes are re-used to reduce plastic waste.

5. **To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.**
6. **Discard flow-through and place the QIAquick column back in the same tube. Centrifuge the column for an additional 1 min.**

IMPORTANT: Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.

7. **Place QIAquick column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.**
8. **To elute DNA, add 50 μ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or H₂O to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30 μ l elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge.**

IMPORTANT: Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 48 μ l from 50 μ l elution buffer volume, and 28 μ l from 30 μ l elution buffer.

Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at -20°C as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

Anexo E.IV. Protocolo QIAEX II Agarose Gel Extraction (QIAGEN)

QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol

This protocol is designed for the extraction of 40-bp to 50-kb DNA fragments from 0.3–2% standard or low-melt agarose gels in TAE or TBE buffers.

- Notes:**
- The yellow color of Buffer QX1 indicates a pH ≤ 7.5 .
 - Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
 - A heating block or water bath at 50°C is required.
 - 3M sodium acetate, pH 5.0, may be necessary.
 - All centrifugation steps are at maximum speed ($\geq 10,000 \times g$, $\sim 13,000$ rpm) in a conventional, table-top microcentrifuge.
 - For DNA fragments larger than 10 kb, mix by gently flicking the tube to avoid shearing the DNA. Do not vortex the tube.

1. **Excise the DNA band from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.**
Minimize the size of the gel slice by removing excess agarose. Use a 1.5-ml microfuge tube for processing up to 250 mg agarose.
2. **Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QX1 to 1 volume of gel for DNA fragments 100 bp – 4 kb; otherwise, follow the table below.**
For example, add 300 μ l of Buffer QX1 to each 100 mg of gel.

DNA fragments < 100 bp	Add 6 volumes of Buffer QX1
DNA fragments > 4 kb	Add 3 volumes of Buffer QX1 plus 2 volumes of H ₂ O
>2% or Metaphor agarose gels	Add 6 volumes of Buffer QX1

3. **Resuspend QIAEX II by vortexing for 30 sec. Add QIAEX II to the sample according to the table below and mix.**

$\leq 2 \mu$ g DNA	Add 10 μ l of QIAEX II
2–10 μ g DNA	Add 30 μ l of QIAEX II
Each additional 10 μ g DNA	Add additional 30 μ l of QIAEX II

4. **Incubate at 50°C for 10 min to solubilize the agarose and bind the DNA. Mix by vortexing* every 2 min to keep QIAEX II in suspension. Check that the color of the mixture is yellow.**
If the color of the mixture is orange or purple, add 10 μ l 3M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color should turn to yellow. The incubation should then be continued for an additional 5 min at least.

The adsorption of DNA to QIAEX II particles is only efficient at pH ≤ 7.5 . Buffer QX1 now contains a pH indicator which is yellow at pH ≤ 7.5 , and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.

5. **Centrifuge the sample for 30 sec and carefully remove supernatant with a pipet.**
6. **Wash the pellet with 500 μ l of Buffer QX1.**

Resuspend the pellet by vortexing*. Centrifuge the sample for 30 sec and remove all traces of supernatant with a pipet. This wash step removes residual agarose contaminants.
7. **Wash the pellet twice with 500 μ l of Buffer PE.**

Resuspend the pellet by vortexing*. Centrifuge the sample for 30 sec and carefully remove all traces of supernatant with a pipet. These washing steps remove residual salt contaminants.
8. **Air-dry the pellet for 10–15 min or until the pellet becomes white.**

If 30 μ l of QIAEX II suspension is used, air-dry the pellet for approximately 30 min. Do not vacuum dry, as this may cause overdrying. Overdrying the QIAEX II pellet may result in decreased elution efficiency.
9. **To elute DNA, add 20 μ l of 10 mM Tris-Cl, pH 8.5 or H₂O and resuspend the pellet by vortexing*. Incubate according to the table below.**

DNA fragments ≤ 4 kb	Incubate at room temp. for 5 min
DNA fragments 4–10 kb	Incubate at 50°C for 5 min
DNA fragments > 10 kb	Incubate at 50°C for 10 min

Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water for elution, make sure that the pH is within this range, and store DNA at -20°C as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

10. **Centrifuge for 30 sec. Carefully pipet the supernatant into a clean tube.**

The supernatant now contains the purified DNA.
11. **Optional: repeat steps 9 and 10 and combine the eluates.**

A second elution step will increase the yield by approximately 10–15%.

* For fragments larger than 10 kb, resuspend the pellet by inverting and flicking the tube. Vortexing can cause shearing of large DNA fragments.

ANEXO F. Marcadores Moleculares

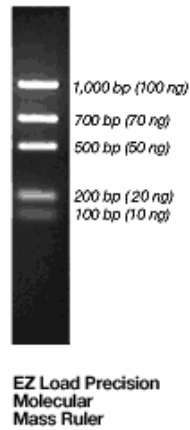


Figura F.1 – Marcador Ez Load Precision Molecular Mass Standard.

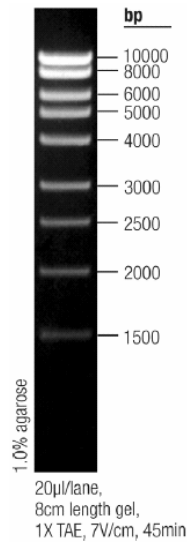


Figura F.2 – Marcador MassRuler, DNA Ladder, High Range.

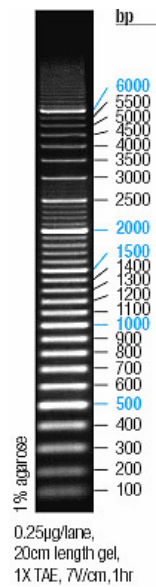


Figura F.3 – Marcador 100+500 bp DNA Ladder (O'RangeRuler).

Anexo G. Equipamentos de Laboratório

Anexo G.I. Equipamentos de Laboratório – Estudo Electroforético

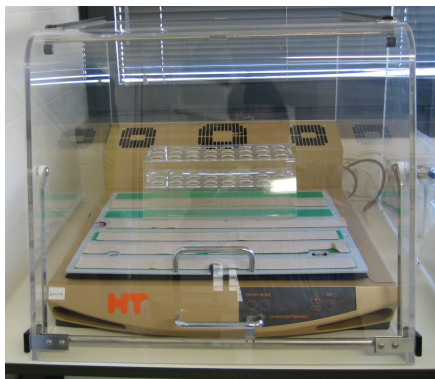


Figura G.1 – Incubadora (HT INFORS AG).

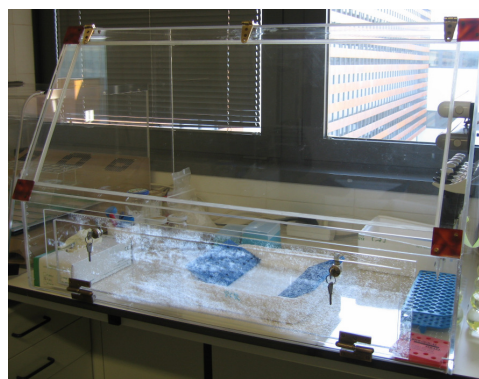


Figura G.2 – Câmara estéril.



Figura G.3 – HOTE química (Flores Valles).

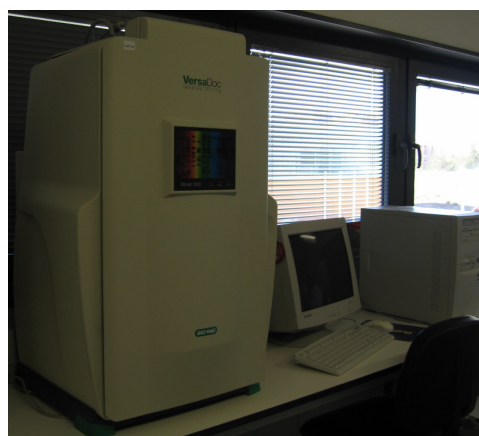


Figura G.4 – Analisador de imagens VersaDOC (BIO-RAD).



Figura G.5 – Centrifuga (HERMLE Z233 K).



Figura G.6 – Centrifuga (HERMLE Z383 K).



Figura G.7 - Termociclador (Modelo Biometra T Gradient).



Figura G.8 - Termociclador (Modelo PCR Express Hybrid).



Figura G.9 – Tina para electroforese em géis de agarose (BIO-RAD).



Figura G.10 – Espectrofotometro, BIO-RAD (Smart-Spec 3000).



Figura G.11 – Tinas verticais para electroforese. A – BIO-RAD; B – Hoefer; C –

Anexo G.II. Equipamentos de Laboratório – Estudo das características físicas da cortiça



Figura G.12 – Paquímetro para medição de espessuras.

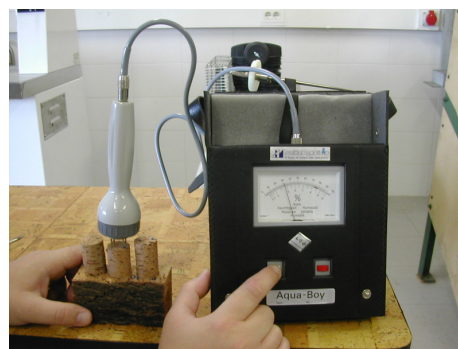


Figura G.13 – Medição da humidade da cortiça utilizando o equipamento Aqua-Boy.



Figura G.14 – Serra de fita para cortar a cortiça em provetes.



Figura G.15 – Lixa e ar comprimido para uniformizar e limpar a superfície do provete, respectivamente.



Figura G.16 – Máquina "cega" para brocar rolhas.



Figura G.17 – Prensa para a realização dos ensaios de torção das rolhas (TC 2000).