



**Contributos para o melhoramento em sobreiro:
Instalação de rebentos *in vitro* visando a obtenção de híbridos.
Fenologia da espécie e ontogenia da sua reprodução sexuada.**

Francisco Manuel Costa Paixão Rosado da Luz

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica – Hortofruticultura e Viticultura

Orientador: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Coorientadores: Doutora Maria Teresa Moreira Valdiviesso

Doutora Maria Carolina Mariano Cardeira Varela

Júri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Vogais: Doutora Maria Teresa Moreira Valdiviesso Spínola, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, coorientadora;

Doutora Célia Maria Romba Rodrigues Miguel, Investigadora Auxiliar do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica do Instituto de Tecnologia Química e Biológica.

Agradecimentos

À Professora Doutora Mariana Mota, orientadora desta dissertação, pelo apoio, pela serenidade, pela compreensão, pelo exemplo, pela orientação, pela motivação, pela disponibilidade e pela incansável e imprescindível ajuda na reta final da dissertação.

À Investigadora Doutora Teresa Valdivieso, coorientadora desta dissertação, por ter estado sempre muito presente, pela grande ajuda em tudo, pela cedência de fotografias, pela paciência, pela generosidade, pela partilha, pelas inúmeras boleias, pela boa disposição contagiante e pelo apoio na fase final da dissertação.

À Investigadora Doutora Maria Carolina Varela, coorientadora desta dissertação, pelas conversas e conselhos, pelo encorajamento, pela partilha de conhecimento, pelo interesse, pelo entusiasmo e pela franqueza.

À Quinta da Serra por terem permitido a recolha de dados e material para este estudo, pelo interesse e pela ajuda em situações de campo.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento das saídas de campo através do projeto PTDC/AGR-GPL/118508/2010 - “Caracterização do Desenvolvimento Reprodutivo de *Quercus suber*”.

Ao INIAV por ter permitido o uso dos seus laboratórios.

À Investigadora Doutora Filomena Nóbrega por ter amavelmente disponibilizado informação relativa a culturas *in vitro* de sobreiro e por gentilmente ter cedido algum material de laboratório.

À Cândida Sofia Trindade pela incondicional ajuda no laboratório e no campo, pela amizade, pelo companheirismo, pelo interesse, pela disponibilidade, pela sinceridade, pela preocupação e pelos conselhos.

Ao Miguel Pimpão, à Catarina Garcia, ao Hugo Nóbrega, à Sara Domingos, ao Miguel Lourenço e ao Jorge Anastácio, também meus parceiros de laboratório, pelo tempo de convívio, amizade e por terem tornado o trabalho mais ligeiro.

À Dona Nídia pela companhia e pelo apoio ao trabalho de laboratório.

Ao grupo de investigadores e auxiliares do INIAV que, de alguma forma, me ajudaram.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todo o meu percurso académico e tornaram a obtenção deste grau possível.

A todos os meus amigos e família, pelo sempre presente interesse pelo desenrolar do trabalho, pelo apoio, pela motivação e pelos momentos de partilha.

A estes e a todos os que, de alguma forma, me acompanharam durante esta jornada e contribuíram para a realização desta dissertação, deixo aqui o meu:

Muito obrigado!

Resumo

Com vista ao melhoramento do sobreiro, ensaiou-se a instalação de segmentos apicais e nodais *in vitro* de material adulto de *Quercus suber* L. colhido diretamente do campo, para posterior instalação expedita de flores femininas *in vitro* e realização de polinizações controladas em placa. O material utilizado nas instalações *in vitro* foi colhido entre abril e setembro de 2013 numa parcela a sul da Península de Setúbal. Também neste âmbito, acompanhou-se durante um ano a fenologia de uma população de 31 árvores dessa parcela e estudou-se em termos histológicos o desenvolvimento ontogenético de estruturas reprodutivas femininas e dos frutos duma árvore. O desenvolvimento dos explantes *in vitro* revelou-se muito difícil, devido a contaminações, oxidações e pouca reatividade dos explantes, parecendo mais promissora a utilização de rebentos na fase de orelha-de-rato (início de alongamento do eixo) colhidos na primavera, desinfecções superficiais com hipoclorito de cálcio e fungicidas e instalação em água de agar, com aplicações de adubo foliar, antes de se passar para meio nutritivo. Na fenologia registou-se variabilidade intraespecífica e esporádicos eventos de floração, externos à primavera. Estabeleceram-se relações entre a fenologia e a ontogenia, observando-se uma longa fase progâmica (80 dias) e uma precoce diferenciação completa dos embriões.

Palavras-chave: *Quercus suber* L., instalação *in vitro*, biologia reprodutiva, fenologia, ontogenia, histologia

Abstract

Focusing cork-oak breeding, we assayed *in vitro* establishments of apical and nodal segments from mature trees of *Quercus suber* L. collected directly from the field, in order to reach a prompt method for controlled pollinations of female flowers established *in vitro*. The plant material used for *in vitro* establishment was sampled between April and September 2013 from a plot in south of Setúbal peninsula. In this context, phenology was monitored in a population of 31 trees from the same plot and the ontogenic development of reproductive female structures and acorns of one tree was histologically studied. The *in vitro* development of explants was very difficult, due to contaminations, tissue oxidation and low reactivity of explants, looking more promising the use of shoots in mouse-ear phenological stage (at the beginning of axis elongation) collected in spring, superficial sterilizations with solutions of calcium hypochlorite and fungicides and culture in agar water, with foliar fertilizer applications, prior being transferred to nutritive medium. Phenological data showed intraspecific variation and sporadic flowering, outside spring. Relationships between phenology and ontogeny were recognized, and a long progamic phase (80 days) and an early full differentiation of embryos have been documented.

Keywords: *Quercus suber* L., *in vitro* establishment, reproductive biology, phenology, ontogeny, histology

Extended abstract

Breeding of woody tree species of long rotation remains less developed than that of short rotation species like poplar, eucalyptus or willow and indeed far behind the work done with conifers. Vegetative propagation has assumed an important role in the development of forest breeding programs. However, vegetative propagation has limited success because it is quite difficult to root cuttings of most tree species (including several species of the genus *Quercus*) if they are harvested from selected adult trees. Further, in the species of the genus *Quercus*, flowering and maturation occur rather late, leading to irregular seed production and storage by conventional methods. According to these limitations in conventional breeding programs, it is a matter of discussion whether biotechnology, namely *in vitro* propagation would be useful in breeding of long rotation woody tree species as the species of the genus *Quercus*. In particular, cork oak breeding has already been discussed for many years.

Tissue culture techniques were first applied to different species of oak as they are a tool for faster production in order to regenerate genotypes with desirable traits without involving gene segregation. These techniques may contribute to mitigate problems associated with low yields of the glans as well as difficulties in obtaining offspring with desirable traits, difficulties in fruit storage and low rooting capacity of cuttings, suggesting to be a good alternative to classical macropropagation methods (cuttings and grafting) of the cork oak. This approach focus on the tissue culture as a method for fast vegetative propagation. However, tissue culture could be a valuable tool in another aspect, namely in frame of controlled hybridizations in order to create new genotypes. In fact, breeding programs in cork oak (*Quercus suber* L.) would benefit from efficient conditions for controlled pollinations of selected genotypes. This issue is of particular importance in forest trees, usually pollinated by the wind. Thus, in frame of cork-oak breeding, focusing on the possibility of controlled pollinations in *in vitro* conditions, *in vitro* establishment of apical and nodal segments from mature trees of *Quercus suber* L. collected directly from the field was assayed, aiming to set a prompt method for *in vitro* establishment of female flowers in order to further conduct controlled pollinations. The plant material used for *in vitro* establishment was sampled between April and September 2013 from a plot in south of Setúbal peninsula. The *in vitro* development of explants was very difficult, due to contaminations, tissue oxidation and low reactivity of explants, looking more promising the use of shoots in mouse-ear phenological stage (at the beginning of axis elongation) collected in spring, superficial sterilizations with solutions of calcium hypochlorite and fungicides and culture in agar water, with foliar fertilizer applications, prior being transferred to nutritive medium.

In another approach, the knowledge of floral biology and phenology of a species is essential for breeding studies, as breeding programs depend largely on seed production in seed orchards and crosses (confirmed by molecular markers) to assess desired genetic parameters. In this context, phenology was monitored in a population of 31 trees from the same plot and the ontogenic development of reproductive female structures and acorns of one tree was histologically studied. Phenological data showed intraspecific variation and sporadic flowering, outside spring. Relationships between phenology and ontogeny were recognized, and a long progamic phase (80 days) and an early full differentiation of embryos have been documented. From all the anatomical aspects studied, the long progamic phase shall be emphasized: in our case, the period between pollination and fertilization was more extensive

than the 45 days reported by other authors (Boavida et al, 1999), however it agrees more to some results presented by Corti in 1955, which admits a period of up to 3 months. It should be noted, however that although the study was only conducted in one tree, with the benchmarks we set for the correlation between phenology and ontogeny, it appears to be acceptable to extrapolate the meaning of this model to the rest of the field at least during the year in which the phenological records were made. The proposed aim of establishing a correlation between the specific morphology (phenology) and anatomy (ontogeny) has been reached, enabling that a phenological observation can be associated to a particular characterization of internal anatomical structures.

Sequential analysis of histological sections of the fruit throughout its life cycle showed that they reach the highest level of differentiation of the internal structures of the embryo at a very early stage of development (growth stage 1), suggesting the possibility that these can be used earlier for *in vitro* installation. However, for *in vitro* establishment, it is noteworthy that the number of branches to be taken must be very high, since not all branches produce female inflorescences, and there is strong variability in flower production (often very sparse) between individuals and over the years. In addition to this problem that there is intense flowers abscission and fruits that can not complete their maturation.

Keywords: *Quercus suber* L., *in vitro* establishment, reproductive biology, phenology, ontogeny, histology

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Extended abstract.....	v
Índice	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Quadros.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. O sobreiro	1
1.1. Taxonomia, origem geográfica e morfologia.....	1
1.2. Condições edafo-climáticas e distribuição natural.....	1
2. Melhoramento de espécies florestais e do género <i>Quercus</i>	2
2.1. Melhoramento no sobreiro	3
2.2. Micropropagação de rebentos axilares no género <i>Quercus</i>	5
2.2.1. Micropropagação em sobreiro.....	10
3. Biologia floral e reprodutiva do sobreiro.....	17
3.1. Morfologia e anatomia das estruturas reprodutivas e dos frutos	17
3.2. Fenologia do sobreiro.....	18
3.3. Comportamento Reprodutivo do Sobreiro	19
3.3.1. Floração masculina	21
3.3.2. Floração feminina	22
3.3.3. Florações atípicas.....	23
3.3.4. Frutificação	24
4. Objetivos.....	26
II. MATERIAIS E MÉTODOS	28
1. Caracterização da parcela.....	28
2. Cultura de tecidos	28
2.1. Recolha e tratamento do material vegetal de campo	28
2.2. Instalação <i>in vitro</i>	29
3. Fenologia.....	33
4. Histologia	34
4.1. Material vegetal	34
4.2. Protocolos	34
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
1. Cultura de tecidos	39
1.1. Instalação <i>in vitro</i> de segmentos apicais e nodais.....	39
1.1.1. Desinfecções.....	39
1.1.2. Repicagens	44
1.1.3. Efeitos dos meios de cultura.....	44

1.2. Instalação <i>in vitro</i> de inflorescências femininas	51
2. Fenologia e biologia reprodutiva do sobreiro	52
2.1. Caracterização climática	52
2.2. Fenologia	52
2.2.1. Evolução do ciclo vegetativo	56
2.2.2. Fenologia e ontogenia de estruturas reprodutivas	57
3. Aspetos a ter em consideração para a colheita de material vegetal para instalação <i>in vitro</i>...	71
3.1. Diferenciação de gomos	72
3.2. Recetividade dos estigmas <i>in vivo</i> vs. <i>in vitro</i>	73
4. Protocolos de histologia	73
IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	75
1. Perspetivas futuras	76
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
VI. ANEXOS.....	84
ANEXO I	84
ANEXO II	86
ANEXO III.....	88

Lista de Figuras

FIGURA 1: MAPA DA ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO NATURAL DO SOBREIRO (<i>QUERCUS SUBER</i> L.). (FONTE: EUFORGEN 2009, WWW.EUFORGEN.ORG).....	1
FIGURA 2: GRÁFICO TERMOPLUVIOMÉTRICO DE SETÚBAL. DADOS MENSIS DA TEMPERATURA MÉDIA DO AR E DA PRECIPITAÇÃO MÉDIA DA QUANTIDADE TOTAL DE UMA SÉRIE DE NORMAIS CLIMATOLÓGICAS NO PERÍODO DE 1981-2010 (DADOS PROVISÓRIOS OBTIDOS NO SITE DO INSTITUTO PORTUGUÊS DO MAR E DA ATMOSFERA: HTTP://WWW.IPMA.PT/PT/ - ACEDIDO ENTRE 29/09/2014 E 02/10/2014).	28
FIGURA 3: DELIMITAÇÃO DA PARCELA DE <i>QUERCUS SUBER</i> NA QUINTA DA SERRA COM A IDENTIFICAÇÃO DAS ÁRVORES ACOMPANHADAS. A ÁRVORE ESTUDADA EM PARTICULAR (ÁRVORE 3) ENCONTRA-SE DESTACADA NO MEIO DA PARCELA. IMAGEM DO GOOGLE EARTH (IMAGEM AÉREA DE 23/06/2007).....	33
FIGURA 4: GRÁFICO TERMOPLUVIOMÉTRICO DE SETÚBAL. NO GRÁFICO ENCONTRAM-SE OS VALORES DAS PRECIPITAÇÕES MENSIS E DAS TEMPERATURAS MÉDIAS MENSIS DO PERÍODO EM QUE SE FEZ O ACOMPANHAMENTO FENOLÓGICO DA PARCELA (MARÇO DE 2013 A MARÇO DE 2014), COMPARADOS COM OS VALORES DAS NORMAIS CLIMATOLÓGICAS DO PERÍODO DE 1981 A 2010 (DADOS PROVISÓRIOS) NOS RESPECTIVOS MESES. DADOS OBTIDOS NO SITE DO INSTITUTO PORTUGUÊS DO MAR E DA ATMOSFERA (HTTP://WWW.IPMA.PT/PT/ - ACEDIDO ENTRE 29/09/2014 E 02/10/2014).	52
FIGURA 5: CICLO FENOLÓGICO DOS SOBREIROS ESTUDADOS NA QUINTA DA SERRA E EM PARTICULAR DA ÁRVORE 3, NO PERÍODO DE MARÇO DE 2013 A MARÇO DE 2014 E FOTOS DOS ESTADOS FENOLÓGICOS CONSIDERADOS.....	55
FIGURA 6: EVOLUÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETATIVO DE MARÇO DE 2013 A MARÇO DE 2014, NO CONJUNTO DAS ÁRVORES EM ESTUDO NA QUINTA DA SERRA (EM CIMA) E NA ÁRVORE 3 (EM BAIXO).....	56
FIGURA 7: EVOLUÇÃO FENOLÓGICA DA FLORAÇÃO FEMININA NA PARCELA ESTUDADA NA QUINTA DA SERRA EM 2013.....	59
FIGURA 8: CORTES HISTOLÓGICOS LONGITUDINAIS DE FLORES FEMININAS DA ÁRVORE 3 NOS ESTÁDIOS FENOLÓGICOS F2F (A, B E C FLORES COLHIDAS A 23/05/2013) E GF (D, E E F FLORES COLHIDAS A 31/05/2013, G E H A 27/06/2013 E I A 20/06/2013).....	60
FIGURA 9: SECÇÕES LONGITUDINAIS DE CORTES HISTOLÓGICOS EM FLORES FEMININAS NO ESTÁDIO FENOLÓGICO HF.....	62
FIGURA 10: ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS PERÍODOS DE ALGUNS DOS EVENTOS MAIS RELEVANTES NO PROCESSO REPRODUTIVO DO SOBREIRO.	63
FIGURA 11: CORTES LONGITUDINAIS DE FLORES FEMININAS REPRESENTATIVOS DE ALGUMAS DAS FASES MAIS RELEVANTES DA EVOLUÇÃO GAMETÓFITO MASCULINO E DA FORMAÇÃO DO GAMETÓFITO FEMININO DURANTE A FASE PROGÂMICA.....	64
FIGURA 12: EVOLUÇÃO FENOLÓGICA DO FRUTO DO ANO NA PARCELA ESTUDADA NA QUINTA DA SERRA EM 2013.	65
FIGURA 13: ONTOGENIA DE FRUTOS NO ESTÁDIO 1 COLHIDOS A 19/09/2013 NA ÁRVORE 3, EM SECÇÕES LONGITUDINAIS.....	67
FIGURA 14: FRUTO NO ESTÁDIO 1 EM 19/10/2013.....	68
FIGURA 15: ONTOGENIA DE FRUTOS ENTRE OS ESTÁDIOS FENOLÓGICOS 2 E 5.....	69
FIGURA 16: ASPETOS DE REBENTOS NO ESTÁDIO FENOLÓGICO ORELHA-DE-RATO, ONDE SE PODERÃO ENCONTRAR AS ESTRUTURAS REPRODUTIVAS FEMININAS INDICADAS (ENTRE DF E EF) PARA UMA INSTALAÇÃO SEM ESTIGMAS CONTAMINADOS COM PÓLEN. (ESCALAS DAS BARRAS: 1CM).	72
FIGURA 17: ESQUERDA – ASPETO EXTERIOR DE GOMOS AXILARES. DIREITA - CORTES HISTOLÓGICOS LONGITUDINAIS DE UM GOMO VEGETATIVO (A), UM GOMO MISTO (MASCULINO E VEGETATIVO - B) E UM GOMO MASCULINO (C). OS GOMOS MISTO E MASCULINO FORAM COLHIDOS A 23/10/2013 E O GOMO VEGETATIVO A 30/10/2013 NA ÁRVORE 3.....	73
FIGURA 18: CABEÇALHO DE UMA FICHA DE REGISTOS FENOLÓGICOS DA QUINTA DA SERRA.....	87

Lista de Quadros

QUADRO 1: METODOLOGIA UTILIZADA POR DIFERENTES AUTORES PARA A INICIAÇÃO DE CULTURAS DE <i>QUERCUS SUBER</i> L. COM ORIGEM EM MATERIAL COM CARACTERÍSTICAS MADURAS.	12
QUADRO 2: PROCESSOS DE DESINFECÇÃO SUPERFICIAL UTILIZADOS NOS EXPLANTES INICIAIS ANTES DA SUA INSTALAÇÃO <i>IN VITRO</i> E RESPECTIVOS CÓDIGOS DE IDENTIFICAÇÃO, USADOS AO LONGO DO TRABALHO PARA REFERIR CADA UM DESTES PROCESSOS.....	30
QUADRO 3: PROCESSOS DE DESINFECÇÃO SUPERFICIAL UTILIZADOS NAS REPICAGENS DOS EXPLANTES E RESPECTIVOS CÓDIGOS DE IDENTIFICAÇÃO, USADOS AO LONGO DO TRABALHO PARA REFERIR CADA UM DESTES PROCESSOS.....	31
QUADRO 4: MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NAS INSTALAÇÕES E REPICAGENS <i>IN VITRO</i> DE EXPLANTES E OS RESPECTIVOS CÓDIGOS DE IDENTIFICAÇÃO, USADOS AO LONGO DO TRABALHO PARA REFERIR CADA UM DESTES PROCESSOS.....	32
QUADRO 5: PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL COLHIDO PARA ACOMPANHAMENTO HISTOLÓGICO DA ÁRVORE 3. NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS DE CADA TIPO DE ESTRUTURA VEGETAL (COLHIDAS EM DIFERENTES DATAS E/OU ESTÁDIOS FENOLÓGICOS) QUE PASSARAM PELA COLHEITA, FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO EM ETANOL A 70% (4 °C), INCLUSÃO EM PARAFINA E O NÚMERO DE AMOSTRAS QUE FORAM CORTADAS E CORADAS.	34
QUADRO 6: COMPOSIÇÃO QUÍMICA BASAL DOS MEIOS NUTRITIVOS MS E WPM, EXPRESSA EM MG/L.	85
QUADRO 7: RELAÇÃO ENTRE A MORFOLOGIA EXTERNA E A ANATOMIA, NAS FASES FENOLÓGICAS DO DESENVOLVIMENTO FLORAL FEMININO Ff, Gf e Hf E NAS FASES FENOLÓGICAS DOS FRUTOS DESDE O ESTÁDIO 1 AO ESTÁDIO 5.	89

I. INTRODUÇÃO

1. O sobreiro

1.1. Taxonomia, origem geográfica e morfologia

O sobreiro é uma árvore Mediterrânica, perenifólia que pertence à ordem *Fagales*, família *Fagaceae*, género *Quercus*, designando-se a espécie *Quercus suber* L. (Natividade, 1950). Alguns autores consideram que a origem do sobreiro se localizou no norte de África, outros pensam que terá sido na região atlântica da Península Ibérica, enquanto outros consideram muito provável, que a sua difusão se tenha feito a partir da área hoje coberta pelo mar Tirreno (DGDR, 2000).

Níveis elevados de diversidade (análise com isoenzimas) encontrados no sul e centro de Espanha sugerem que a Península Ibérica é um centro de diversidade e foi um refúgio glacial para esta espécie (Gil e Varela, 2008).

O sobreiro apresenta um crescimento lento, podendo a árvore viver até aos 200-250 anos a produzir com qualidade, havendo registo de indivíduos mais velhos. É uma árvore de porte médio costumando atingir entre 15-20 m de altura, mas pode crescer até aos 25 m em condições ideais. O diâmetro do tronco à altura do peito pode chegar aos 200 cm (Natividade, 1950; Franco, 1971; Gil e Varela, 2008). Em árvores isoladas apresenta um fuste curto e grosso, conferindo à copa uma forma arredondada, que se expande mais no sentido da largura do que em altura. No caso de povoamentos densos, o sobreiro adquire um porte quase fusiforme, predominando neste caso, o crescimento em altura (Natividade, 1950).

1.2. Condições edafo-climáticas e distribuição natural

Esta espécie exige uma temperatura média anual entre 13 e 18°C e não tolera temperaturas inferiores a -10°C. A sua distribuição natural (figura 1) está então limitada às regiões costeiras da Bacia

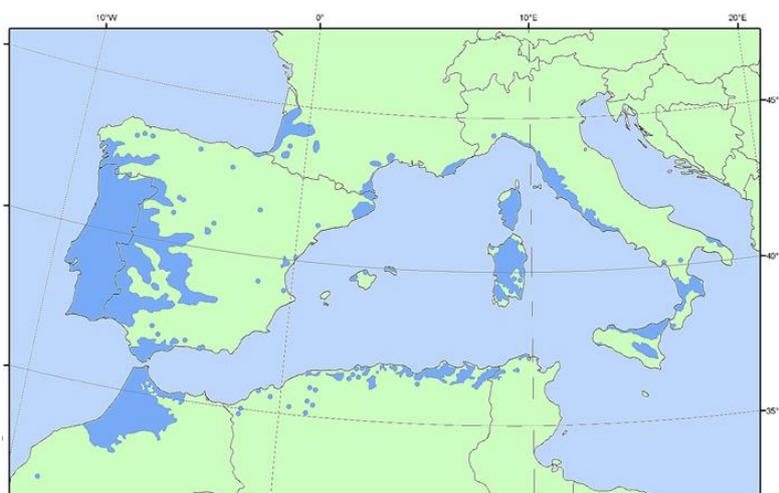


Figura 1: Mapa da área de distribuição natural do sobreiro (*Quercus suber* L.). (Fonte: EUFORGEN 2009, www.euforgen.org)

do Mediterrâneo ocidental, incluindo a Argélia, França, Itália, Marrocos, Portugal, Espanha e Tunísia, as ilhas da Córsega, Sardenha e Sicília e áreas limitadas nas ilhas Maiorca e Minorca. As áreas florestadas mais extensivas encontram-se nas zonas de influência atlântica na Península Ibérica. O extremo oriental da espécie fica na costa adriática da Apúlia, em Itália. Desenvolve-se num amplo intervalo de precipitação anual,

desde os 479 mm em Mamora (Marrocos) a 2400 mm em algumas regiões do noroeste de Portugal e no sul de Espanha (Gil e Varela, 2008).

Portugal desfruta de um clima com características mediterrâneas: temperatura elevada, secura estival e precipitação moderada, concentrada no inverno e grande insolação, sendo assim um local privilegiado para o desenvolvimento desta espécie (Natividade, 1950).

Quanto aos solos, em Portugal, o sobreiro encontra-se representado em quase todos os tipos de solos, embora se observe um melhor desenvolvimento nos solos mais arenosos. É apenas excluído por solos demasiadamente argilosos ou onde se verifica a presença de calcário ativo. Relativamente ao pH, o sobreiro desenvolve-se em solos alcalinos, mas prefere os ácidos (Natividade, 1950).

O sobreiro evidencia assim uma grande facilidade de adaptação, pois consegue vegetar em terras muito secas e pobres e em condições de clima bastante adversas (Natividade, 1950).

2. Melhoramento de espécies florestais e do género *Quercus*

O melhoramento de espécies florestais lenhosas de longa rotação permanece menos desenvolvido que o das de rotações curtas (choupos, eucaliptos, salgueiros) e sempre ficou muito atrás do das coníferas. Investimentos em projetos com vida útil de mais de 40 anos, como os necessários para as espécies lenhosas de longa rotação, nunca foram muito atrativos (Vieitez *et al.*, 2012).

Os programas convencionais de melhoramento de espécies arbóreas compreendem vários passos incluindo: 1 - ensaios de proveniência e/ou parcelas de origem natural como ponto de partida (populações base); 2 - estabelecimento de áreas de produção de semente; 3 - seleção fenotípica de árvores "plus" que podem ser enxertadas e plantadas num banco de clones; 4 - ensaios de descendência e produção de pomares de semente para identificação de indivíduos com bons genótipos e alta capacidade combinatória; 5 - propagação vegetativa (Vieitez *et al.*, 2012).

A propagação vegetativa tem vindo a assumir um papel importante no desenvolvimento de programas de melhoramento florestal. Tem sido largamente utilizada na conservação de genótipos em parques clonais e no estabelecimento de pomares produtores de sementes, reunindo num mesmo local indivíduos que na natureza nunca se cruzariam. Outras aplicações deste método consistem na avaliação de genótipos e da interação genótipo-ambiente, o estudo de possíveis correlações genéticas, ou como forma de avaliar o ganho genético. Em espécies cujo material vegetativo apresente elevada capacidade de enraizamento, esta via de propagação é sugerida como alternativa para a reprodução rápida de indivíduos geneticamente superiores, na medida em que permite a redução temporal entre a seleção e a produção comercial (Roldão, 1995; Carrasquinho, 2000a).

A propagação vegetativa é de sucesso limitado porque é bastante difícil enraizar estacas da maioria das espécies florestais (incluindo várias espécies do género *Quercus*) se forem colhidas de árvores adultas selecionadas. Quanto à enxertia, por vezes ocorrem problemas de incompatibilidade que podem só manifestar-se anos mais tarde (Coggeshall, 1996 in Vieitez *et al.*, 2012).

Ainda nas espécies do género *Quercus*, a maturação e floração são tardias, apresentando produções de semente irregulares e produzindo sementes recalcitrantes ao armazenamento através de métodos convencionais (Vieitez *et al.*, 2012).

De acordo com estas limitações, nos programas convencionais de melhoramento mantém-se a questão sobre se a biotecnologia seria útil no melhoramento genético das espécies florestais lenhosas de longa rotação como as espécies do género *Quercus* (Vieitez *et al.*, 2012).

2.1. Melhoramento no sobreiro

A necessidade de melhoramento no sobreiro já vem sendo discutida desde há muitos anos, tendo o professor Vieira Natividade sido um dos primeiros grandes dinamizadores deste assunto em Portugal, escrevendo já em 1934: “*Que é urgente melhorar a qualidade das nossas cortiças, e que só assim podemos atenuar a concorrência futura, é evidente. A criação de novos sobreirais, ou a regeneração dos decrépitos, utilizando plantas de origem conhecida, é a solução do problema. Daí a importância que os trabalhos de investigação e experimentação neste campo apresentam, e a necessidade de os intensificar e ampliar.*”.

Um dos principais objetivos a atingir no melhoramento genético do sobreiro em Portugal, continua a ser o aumento da produção de cortiça nos nossos montados, em qualidade mas também em quantidade, com obtenção de árvores que formem cortiça com o mínimo de porosidade e de outros defeitos constituintes, e também que produzam o máximo de matéria-prima, no mais curto intervalo de tempo, para satisfazer tanto a indústria de rolhas de alta qualidade, como a indústria de aglomerados. Para além da cortiça interessa também melhorar a produção de glande para a alimentação animal (Gomes, 1989; Ribeiro, 1995; Roldão, 1995; Carrasquinho, 2000a; Varela, 2007). Nestes programas de melhoramento devem ter-se em consideração outras questões como a orientação e linearidade do fuste, a alternância dos hábitos de frutificação, ou a resistência/tolerância a pragas e doenças (Carrasquinho, 2000b). Por exemplo, uma vez que a *Phytophthora cinnamomi* tem sido uma das doenças mais associados ao declínio dos sobreiros (Camilo-Alves *et al.*, 2013), o nível de tolerância a esta doença do genótipo a propagar deveria ser um ponto a considerar num programa de melhoramento.

O recurso à seleção de indivíduos superiores, a hibridação, no sentido de reunir os caracteres favoráveis e a multiplicação com recurso às técnicas de multiplicação vegetativa são metodologias para atingir objetivos estabelecidos (Carrasquinho, 2000a), em esquemas de seleção massal, clonal, recorrente (controlada com testes de descendências ou progénie), entre outros (Gadanhó, 2000).

Na década de 80 surgiram alguns trabalhos que definem estratégias e linhas gerais para serem aplicadas em programas de melhoramento para o sobreiro (Roldão, 1986; Gomes, 1989).

Em 1993, Alpuim e Roldão apresentaram uma estratégia de melhoramento para o sobreiro que combina a via seminal com a via vegetativa na avaliação dos parâmetros genéticos. Os autores propõem também a aplicação das técnicas de enxertia e micropropagação, como uma forma de rejuvenescimento e de propagação para o viveiro das árvores adultas selecionadas, e a estacaria, como o processo de multiplicação em massa desse material. Mais tarde, Varela e Eriksson (1995), numa apreciação desta estratégia, salientam a necessidade de investir esforços no desenvolvimento de técnicas de macropropagação vegetativa, como forma de reproduzir e multiplicar as plantas fenotipicamente superiores. Sugerem, no entanto, que a via para o conhecimento do controlo genético da qualidade da cortiça seria mais fiável se se procedesse ao seu estudo a partir de uma amostra de descendentes de progenitores escolhidos numa população de regeneração natural, em vez de descendentes de árvores fenotipicamente superiores, na medida em que a primeira permite melhor adaptação a diferentes condições edafoclimáticas e até a stresses bióticos. Estes autores consideraram ainda que o comportamento reprodutivo é um aspeto determinante do sistema genético, cujo

conhecimento é essencial no delineamento de estratégias de melhoramento e de conservação dos recursos genéticos. A utilização de métodos de propagação adequados é então um ponto fulcral, tanto no melhoramento da espécie como na sua propagação em massa para utilização nas explorações agrícolas (Gadanho, 2000).

Num programa de melhoramento para o sobreiro podem ser encontradas duas vias: a de longo prazo iniciada por ensaios de proveniências, de preferência ao longo de toda a área de distribuição da espécie e outra a curto prazo, onde se poderão selecionar áreas de montado extreme, cuja produção de cortiça em qualidade e quantidade seja acima da média, e onde a maioria dos sobreiros reúna essas características, sem ataques de pragas e doenças e com boa conformação de tronco e copa (Ribeiro, 1995).

O melhoramento tem também um papel importante na reflorestação de áreas degradadas do montado de sobreiro que surgem um pouco por todo país, com árvores mortas ou com mau desenvolvimento vegetativo e sintomas evidentes de ataques de pragas e/ou doenças (Ribeiro, 1995).

Qualquer que seja a opção de estratégia a aplicar para o sobreiro, é necessário continuar a desenvolver estudos que, a seu tempo, contribuirão para aumentar a eficiência de um programa de melhoramento (Carrasquinho, 2000b). Neste sentido, desenvolvem-se estudos relacionados com regiões de proveniência, ensaios de proveniências e de descendências, análise da estrutura genética através de marcadores moleculares, biologia floral, multiplicação vegetativa, culturas de tecidos *in vitro*, entre outras (Romano *et al.*, 1992b; Romano, 1994; Varela e Valdivieso, 1996; Varela, 1997; Roldão, 2000; Carrasquinho, 2002; Nóbrega *et al.*, 2002).

São, contudo, conhecidas algumas dificuldades no que diz respeito à implementação de programas convencionais de melhoramento do sobreiro, cujo objetivo será criar populações mais adaptadas às condições edafoclimáticas e/ou que produzam mais e melhor cortiça. Entre essas dificuldades destacam-se o lento crescimento, a tardia frutificação, irregularidade do ciclo reprodutivo com imprevisibilidade de produção de frutos, elevada heterozigocidade desta espécie alogâmica (grande variabilidade da descendência, com genótipos desfavoráveis), a dificuldade de armazenamento dos frutos (recalcitrantes), difícil implementação de opções de propagação vegetativa, o espaço exigido para o estabelecimento de testes genéticos, o longo período necessário para avaliação da qualidade da cortiça e baixas correlações entre as características nas fases juvenil e adulta (Alpuim e Roldão, 1993; Ribeiro, 1995; Roldão, 1995; Boavida *et al.*, 1999; Carrasquinho, 2000b; Pintos *et al.* 2007).

A aplicação de novas abordagens tecnológicas a espécies lenhosas de longa rotação pode ser interessante para acelerar os programas de melhoramento de espécies florestais (Vieitez *et al.*, 2012) conduzindo a práticas menos convencionais de melhoramento das espécies.

As técnicas de cultura de tecidos foram inicialmente aplicadas a diferentes espécies de carvalhos porque são uma ferramenta para a produção mais rápida de genótipos para regenerar árvores com características desejáveis e para perpetuar toda a superioridade genética sem envolver segregação de genes. Estas técnicas contribuem, pelo menos em teoria, para mitigar problemas relacionados com baixas produções de glande, numa base anual, nas árvores selecionadas, assim como dificuldades na obtenção de descendência com características desejáveis, dificuldades no armazenamento de frutos e a baixa capacidade de enraizamento de estacas (Vieitez *et al.*, 2012).

A micropropagação, com todas as vantagens inerentes, aparece como uma hipotética boa alternativa a métodos de macropropagação (estacaria, enraizamento dos rebentos de toixa e enxertia) do sobreiro. De uma forma mais imediata, pode ser usada no estudo da diversidade genética pelo uso de técnicas de análise de DNA, na formação de bancos de germoplasma, como método de rejuvenescimento de tecidos com origem em árvores muito velhas e no melhoramento da espécie, como eventual técnica de produção de clones em massa para a reflorestação (Gadanhó, 2000).

2.2. Micropropagação de rebentos axilares no género *Quercus*

As plantas lenhosas são um grupo particularmente difícil de propagar *in vitro*, apresentando uma fraca capacidade de regeneração, sendo difícil a indução de rejuvenescimento; tendência para a exsudação de substâncias tóxicas para o meio de cultura, nomeadamente compostos fenólicos; baixa taxa de multiplicação; ciclos de dormência durante os quais o desenvolvimento dos meristemas é muito difícil; frequente ocorrência de fenómenos de topófise (i.e., efeito da posição do explante inicial na planta-mãe, no seu posterior desenvolvimento *in vitro*); desinfeção superficial difícil, pois crescem normalmente no exterior, e possuem ainda diversos tecidos externos protetores que dificultam a penetração dos agentes desinfetantes; dificuldade de enraizamento dos rebentos, especialmente quando o material provem de árvores adultas (vários autores in Romano, 1994).

Um dos principais objetivos na micropropagação de carvalhos tem então sido a sua regeneração *in vitro* tentando-se desenvolver protocolos que possibilitem a produção comercial de genótipos-plus. Para este fim um dos requisitos das culturas *in vitro* é que o material original apresente características fisiologicamente juvenis (Chalupa, 1993; Evers *et al.*, 1993; Gebhardt *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993, 1994; Sanchez *et al.*, 1996). É sabido que quanto mais jovem for um explante mais reativo será e consequentemente terá maior capacidade de multiplicação e enraizamento, o que levará a um maior sucesso na regeneração *in vitro* (San-Jose *et al.*, 1990; Evers *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1994). Estas características são facilmente encontradas em explantes com origem em embriões ou jovens plantas com alguns meses de idade (Manzanera e Pardos, 1990; Carvalho, 1992; Chalupa, 1993; Evers *et al.*, 1993; Meier-Dinkel *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993; Kartsonas e Papafotiou, 2007; Vengadesan e Pijut, 2009). Contudo, se se utilizarem explantes com origem em árvores adultas o desempenho *in vitro* passa a ser mais recalcitrante (San-Jose *et al.*, 1990; Romano e Martins-Loução, 1992; Chalupa, 1993; Evers *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993; Kartsonas e Papafotiou, 2007). Em muitas espécies lenhosas, a propagação a partir de árvores com mais de 6 a 8 anos é difícil e necessita de rejuvenescimento (Evers *et al.*, 1993; Savill e Kanowski, 1993 in Sanchez *et al.*, 1996). Numa árvore adulta de *Quercus*, considera-se que o material que conserva características de juvenilidade e com maiores probabilidades de enraizamento encontra-se na parte basal da árvore, sendo por exemplo os rebentos com origem em toixas muito utilizados (Manzanera e Pardos, 1990; Carvalho, 1992; Gebhardt *et al.*, 1992; Chalupa, 1993; Evers *et al.*, 1993; Gebhardt *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993, 1994; Sanchez *et al.*, 1996). A juvenilidade parece ir-se perdendo quando se recorre a material de ramos cada vez mais altos na copa (Vieitez *et al.*, 1993, 1994). Para *Q. robur*, Sanchez *et al.* (1996) chegaram mesmo a considerar um gradiente de crescente maturidade da base para o topo da árvore. Para contornar as dificuldades na micropropagação de material de origem adulta pode-se recorrer a técnicas de rejuvenescimento do material de origem (Manzanera e Pardos, 1990; Evers *et al.*, 1993; Romano, 1994; Vieitez *et al.*, 1994,

2009; Sanchez *et al.*, 1996; Lorenzo *et al.*, 2001) e/ou dos próprios explantes, já instalados *in vitro*, através de sucessivas subculturas cujo número necessário pode estar associado à idade do genótipo (San-José *et al.*, 1988; Romano *et al.*, 1992a; Evers *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1996). Assim, utilizando metodologias de rejuvenescimento ou de revigoração do material mais recalcitrante, conseguiu-se superar problemas relacionados com a idade e pouca reatividade do material mais adulto (mais envelhecido), especialmente nas fases de multiplicação e enraizamento. Brevemente, um exemplo de metodologia de rejuvenescimento deste tipo de material, pode passar pela recolha de segmentos de ramos (por exemplo com 2-5 cm de diâmetro e 25-30 cm de comprimento) ou até raminhos das copas de árvores adultas, promovendo-se de seguida a sua desfolha (muitas vezes precedida e/ou seguida de desinfecções superficiais, sobretudo com fungicidas, e tratamentos no frio durante determinados períodos de tempo) e forçando depois a abrolhar gomos epicórmicos ou secundários (conhecidos por apresentarem características de juvenildade, com entrenós longos e folhas de aspeto juvenil, com lóbulos menores) induzidos sobre condições controladas (requerendo invariavelmente humidades relativas elevadas, superiores a 80%, com valores de temperaturas na ordem dos 20-25°C e fotoperíodos de 16h). Sem estes pré-condicionamentos e tratamentos prévios do material “maduro” (especialmente com origem nas copas), mesmo quando são aplicadas técnicas de rejuvenescimento *in situ*, revela-se muito difícil a instalação e estabelecimento de explantes *in vitro* devido sobretudo a problemas com contaminações mas também com falta de reatividade (Romano *et al.*, 1992a; Evers *et al.*, 1993; Romano, 1994; Vieitez *et al.*, 1994, 2009). Vieitez *et al.* (2009), chegaram mesmo a atribuir o sucesso no controlo das contaminações dos explantes iniciais ao facto deste material ter sido colhido de rebentos (abrolhados de segmentos de ramos velhos) que cresceram sobre condições controladas em câmaras de crescimento. Normalmente, o material de origem adulta (especialmente o material com origem nas copas) é colhido no final do repouso vegetativo (Evers *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1994, 2009), que na maioria destas espécies coincide com o final do inverno. Quando se colhe o material mais cedo no período de repouso vegetativo, procede-se normalmente a períodos de armazenamento no frio (aproximadamente 4°C), durante determinados períodos (Vieitez *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1996). Em qualquer um dos casos anteriores, este material é depois forçado a abrolhar sobre condições controladas. Existe, contudo, a possibilidade de se utilizar material colhido noutras épocas do ano como em *Q. suber*, em que é possível usar-se material colhido durante todo ano (Romano e Martins-Loução, 1992; Romano, 1994) ou em *Q. petraea* onde já se relatou a iniciação de culturas recorrendo a material em crescimento ativo colhido de jovens plantas (2-5 meses) em câmaras de crescimento e estufas entre março e julho (San-Jose *et al.*, 1990).

Na fase de iniciação e estabelecimento de culturas assépticas *in vitro*, diferentes espécies de *Quercus* apresentam diferentes durações no desenvolvimento dos explantes iniciais, com aparecimento e evolução de novos rebentos que pode levar entre um a dois meses (Romano e Martins-Loução, 1992; Chalupa, 1993; Meier–Dinkel *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993, 1994, 2009; Puddephat *et al.*, 1997; Lorenzo *et al.*, 2001; Vengadesan e Pijut, 2009) até conseguirem atingir um tamanho aceitável para serem isolados e transferidos para novo meio de cultura dando assim origem à fase de multiplicação da cultura. Vieitez *et al.* (2009) reportaram, por exemplo, o abrolhamento de gomos e crescimento dos rebentos nos explantes iniciais, de material com 6 e 7 anos de idade, em *Q. alba*, num

período de 7 semanas, em *Q. rubra* de 6 semanas e em *Q. Bicolor* de 4–5 semanas. Neste período as culturas podem ser repicadas para meio fresco periodicamente (por exemplo, quinzenalmente) (Manzanera e Pardos, 1990; Vieitez *et al.*, 1993, 1994; 2009; Lorenzo *et al.*, 2001). Nesta fase há autores que consideram eficaz o tratamento com citocininas (BAP) para a ativação do desenvolvimento dos rebentos axilares, em concentrações e condições de temperatura adequadas (San-José *et al.*, 1988, 1990; Manzanera e Pardos, 1990; Puddephat *et al.*, 1997; El-Kbiach *et al.*, 2002a).

Na proliferação das culturas, fatores como o genótipo (entre espécies e entre clones da mesma espécie), a origem do explante (grau de juvenilidade) e efeito de topófise [relacionado com ponto anterior], tipo de explante (proveniente de segmentos nodais ou apicais), a composição mineral do meio de cultura, a ação de reguladores de crescimento (sobretudo citocininas, como BAP), transferências dos explantes para meio fresco durante o ciclo de multiplicação, orientação dos explantes no meio de cultura (horizontal ou vertical) e mesmo a temperatura de incubação das culturas podem afetar a resposta das culturas, no que diz respeito à estabilização da produtividade, aumento das taxa de multiplicação (maiores produtividades), à reatividade, alongamento dos rebentos e/ou número de rebentos abrolhados por explante (San-José *et al.*, 1988, 1990; Manzanera e Pardos, 1990; Romano *et al.*, 1992a; Chalupa, 1993; Gebhardt *et al.*, 1993; Meier–Dinkel *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993, 1994, 2009; Puddephat *et al.*, 1997; Lorenzo *et al.*, 2001; El-Kbiach *et al.*, 2002b; Purohit *et al.*, 2002; Kartsonas e Papafotiou, 2007; Ostrolucká *et al.*, 2007; Tamta *et al.*, 2008; Vengadesan e Pijut, 2009). Relativamente à taxa de multiplicação encontram-se benefícios, repicando o mesmo explante várias vezes (San-José *et al.*, 1988, 1990; Vieitez *et al.*, 1993, 1994). Em *Q. robur* (San-José *et al.*, 1988; Vieitez *et al.*, 1994) e *Q. rubra* (Vieitez *et al.*, 1993) verificou-se que, depois da terceira repicagem do mesmo explante-mãe, a reatividade deste começa a diminuir produzindo menos rebentos. A duração dos ciclos de multiplicação pode variar, tendo em conta os fatores descritos acima e os requisitos que os autores acharem necessários para se proceder à próxima subcultura (por exemplo, o tamanho e vigor dos explantes), mas na maioria dos casos relataram-se períodos de 4-6 semanas entre ciclos (San-José *et al.*, 1988; Manzanera e Pardos, 1990; Romano *et al.*, 1992a; Gebhardt *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993, 1994, 2009; Sanchez *et al.*, 1996; Puddephat *et al.*, 1997; Lorenzo *et al.*, 2001; Purohit *et al.*, 2002; Kartsonas e Papafotiou, 2007; Ostrolucká *et al.*, 2007).

O declínio da capacidade de multiplicação de culturas com orientação vertical depois de várias subculturas é um ponto comum mencionado em muitas espécies de carvalhos (Vieitez *et al.*, 2012). Esta diminuição pode estar relacionada com um pré-determinismo genético caracterizado por um crescimento descontínuo (com fortes e episódicos surtos de crescimento) que algumas espécies lenhosas perenes apresentam, podendo ser um problema transversal a todas as fases da micropropagação (McCown, 2000). Vieitez *et al.* (1993), sobre este tema em *Q. rubra*, consideraram que as culturas verticais de rebentos apresentam uma paragem de crescimento durante as subculturas e necroses apicais. Contudo, através da utilização de protocolos em que os explantes (rebentos) são colocados no meio numa posição horizontal em vez da vertical, normalmente utilizada, conseguiram-se obter e proliferar culturas saudáveis e regenerar espécies como o *Q. robur* (San-José *et al.*, 1988; Sanchez *et al.*, 1996), *Q. rubra* (Vieitez *et al.*, 1993, 2009; Sanchez *et al.*, 1996), *Q. alba* e *Q. bicolor* (Vieitez *et al.*, 2009). Desta forma, Vieitez *et al.* (2009) conseguiram contornar o problema da

incapacidade de estabilização (crescimento uniforme e contínuo dos rebentos) na fase de proliferação nas espécies *Q. bicolor*, *Q. alba* e *Q. rubra*, utilizando um protocolo em que explantes, com mais de 1 cm, “decapitados” (2 mm apicais removidos) eram dispostos na horizontal sobre o meio, conseguindo assim obter um desenvolvimento vigoroso dos rebentos, possivelmente devido à diferente distribuição dos reguladores de crescimento endógenos e ao maior fornecimento de nutrientes (Vieitez *et al.*, 1993). No entanto, sendo esta uma posição de stress mecânico para os explantes, pode ter sido favorecida a produção de etileno que se acumula na atmosfera do contentor de cultura (Anten *et al.*, 2006) e que pode levar a necroses dos ápices e abscisão de folhas (Vieitez *et al.*, 2009).

Esta metodologia é sobretudo aplicada, na maioria dos trabalhos, na fase de multiplicação e proliferação das culturas. Contudo, Vieitez *et al.* (1993) experimentaram esta metodologia noutras fases da micropropagação de *Q. rubra*, nomeadamente na iniciação/estabelecimento da cultura, fase na qual obtiveram resultados positivos, com os explantes iniciais na horizontal mais reativos e produzindo novos rebentos de melhor qualidade do que os instalados na posição vertical tratados de forma idêntica, com as mesmas características (exceto no comprimento do explante) e do mesmo genótipo.

Para além da orientação das culturas *in vitro* como meio para ultrapassar os efeitos do crescimento episódico nalgumas espécies de carvalhos, foram também encontrados benefícios na transferência periódica para meio fresco e na utilização de citocininas no estabelecimento da cultura (Vieitez *et al.*, 1993, 1994, 2009).

No que diz respeito à vitalidade dos explantes, encontraram-se benefícios deslocando os explantes iniciais, um (Vieitez *et al.*, 1994, 2009), dois dias (Romano e Martins-Loução, 1992) ou até uma semana (Manzanera e Pardos, 1990) após a sua instalação, para meio fresco ou para zonas do meio de cultura afastadas do local onde originalmente foram instalados, para minimizar os efeitos negativos dos fenóis e outros exsudados.

Relativamente aos meios de cultura, os meios de baixa concentração salina, originais ou modificados, como o GD e o WPM, têm sido os preferencialmente utilizados na micropropagação de espécies do género *Quercus* (San-José *et al.*, 1998, 1990; Romano e Martins-Loução, 1992; Romano *et al.*, 1992a; Chalupa, 1993; Evers *et al.*, 1993; Gebhardt *et al.*, 1993; Meier-Dinkel *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993, 1994; 2009; Sanchez *et al.* 1996; Puddephat *et al.*, 1997, 1999; Lorenzo *et al.*, 2001; Purohit *et al.*, 2002; Kartsonas e Papafotiou, 2007; Ostrolucká *et al.*, 2007; Tamta *et al.*, 2008). Nalgumas espécies deste género, como *Q. petraea* e *Q. robur*, a composição mineral dos meios de cultura não foi decisiva na iniciação da cultura, tendo contudo os melhores resultados nas taxas de multiplicação sido conseguidos com os meios GD e/ou WPM, durante a proliferação de rebentos, enquanto meios com elevada concentração salina, como o MS, deram origem a rebentos pequenos e mal desenvolvidos, por vezes com necroses e hiperhídricos (San-Jose *et al.*, 1990; Romano *et al.*, 1992a; Chalupa, 1993). Manzanera e Pardos (1990) obtiveram resultados semelhantes na iniciação de culturas de *Q. suber* com material de origem juvenil, testando 7 meios diferentes. No entanto, em material de origem adulta, as culturas responderam de diferentes formas, não se conseguindo obter qualquer resposta no meio MS (meio de alta concentração salina). Os efeitos negativos dos meios de elevada concentração salina estão assim documentados na micropropagação de rebentos em espécies do género *Quercus* (Romano e Martins-Loução, 1992; Chalupa, 1993; Romano, 1994).

No tópico das contaminações *in vitro*, alguns autores (Romano e Martins-Loução, 1992; Vieitez *et al.*, 1993; 1994, 2009; Lorenzo *et al.*, 2001) associam o sucesso do seu controlo nos explantes iniciais, especialmente proveniente de plantas adultas, a fases anteriores de desinfecções superficiais (normalmente com fungicidas) e/ou armazenamento no frio, do material-mãe vegetal colhido no campo (normalmente, segmentos de ramos lenhosos) e que é depois forçado a abrolhar em câmaras de crescimento, como visto anteriormente, obtendo-se material mais reativo (explantes iniciais). Estes tratamentos prévios em sinergia com as desinfecções superficiais dos explantes iniciais antes da instalação *in vitro*, são responsáveis por um bom controlo inicial das contaminações. Nestas desinfecções superficiais dos explantes são utilizadas soluções aquosas de agentes desinfetantes como etanol 70%, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e outros derivados de cloro, cloreto de mercúrio, Tween 80, Tween 20 e detergentes comerciais, utilizados em conjunto ou separadamente, por períodos e concentrações variáveis, em passos de um processo que termina habitualmente com lavagens com água destilada esterilizada antes da instalação dos explantes (San-José *et al.*, 1988, 1990; Manzanera e Pardos, 1990; Romano e Martins-Loução, 1992; Chalupa, 1993; Meier–Dinkel *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993; 1994, 2009; Puddephat *et al.*, 1997; Lorenzo *et al.*, 2001; El-Kbiach *et al.*, 2002a; Purohit *et al.*, 2002; El Kbiach *et al.*, 2004; Kartsonas e Papafotiou, 2007; Ostrolucká *et al.*, 2007; Tamta *et al.*, 2008; Vengadesan e Pijut, 2009).

Na fase de enraizamento, coloca-se os rebentos isolados (1,5-3 cm) em meio de cultura com IBA (ácido indolbutírico) ou NAA (ácido naftalenoacético) normalmente durante aproximadamente uma semana, sendo depois transferidos para meio sem auxinas (Manzanera e Pardos, 1990; Chalupa, 1993; Juncker e Favre, 1989; Vieitez *et al.*, 1994; Puddephat *et al.*, 1999; Lorenzo *et al.*, 2001; Kartsonas e Papafotiou, 2007). Os meios utilizados nesta fase têm as concentrações reduzidas, normalmente para metade ou até menos. Mergulhando a extremidade basal do rebento durante 1-2 min. numa solução com alta concentração de IBA (1 g/l) e transferindo o rebento depois para meio sem auxinas é uma metodologia que também pode ser utilizada nesta fase (San-José *et al.*, 1988, 1990; Manzanera e Pardos, 1990; Vieitez *et al.*, 1993; El Kbiach *et al.*, 2004). Em todos os genótipos testados, o carvão vegetal e/ou outras fontes de carbono (como a sacarose), beneficiaram tanto a qualidade dos rebentos como o desenvolvimento do sistema radicular, sendo este último favorecido pela formação de muitas raízes adventícias (Romano *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 1996; Vieitez *et al.*, 2009). Períodos de escuridão, no início do processo de enraizamento podem também ser utilizados (Vieitez *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 1996; Romano e Martins-Loução, 2003; Vengadesan e Pijut, 2009). Foi ainda realizado o enraizamento *ex vitro* em microestacas de *Q. robur*, que foram tratados com pó de enraizamento comercial, num substrato de 80% turfa e 20% perlite e colocados em túneis de plástico, aquecidos por baixo, em grandes estufas de vidro (Meier–Dinkel *et al.*, 1993). A vantagem deste último processo seria a eliminação da fase de enraizamento sobre condições estéreis, ocorrendo o enraizamento e a aclimatização simultaneamente, simplificando-se o processo e reduzindo-se os custos de produção. Contudo, o enraizamento *ex vitro* requer rebentos de alta qualidade, tendo os autores obtido os melhores resultados com microestacas obtidos de segmentos basais com presença de *callus*. A aclimatização é a fase crítica de transferência das plantas regeneradas, em parte ou na totalidade, *in vitro* para condições de campo, tendo sido descrita no género *Quercus*, por exemplo, em *Q. petraea* e

Q. robur (Chalupa, 1993), em *Q. suber* (Romano e Martins-Loução, 2003; El Kbiach *et al.*, 2004) ou em *Q. rubra* (Vengadesan e Pijut, 2009).

Quanto aos efeitos do genótipo na micropropagação e regeneração de plantas, foram constatadas diferenças significativas entre genótipos/clones em várias espécies do género *Quercus* (San-José *et al.*, 1988, 1990; Juncker e Favre, 1989; Gebhardt *et al.*, 1992; Chalupa, 1993; Evers *et al.*, 1993; Gebhardt *et al.*, 1993; Meier–Dinkel *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993, 1994, 2009; Puddephat *et al.*, 1997; Lorenzo *et al.*, 2001; Vengadesan e Pijut, 2009) sendo, por exemplo, estas diferenças em *Q. robur* grandes o suficiente para explicar a falta de reprodutibilidade na reatividade inicial na fase de estabelecimento, na fase de multiplicação e na capacidade de enraizamento de culturas, registando-se diferenças elevadas entre genótipos da mesma proveniência, mas sem diferenças significativas entre locais de proveniência (Juncker e Favre, 1989; Meier–Dinkel *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1994; Puddephat *et al.*, 1997).

A regeneração de plantas *in vitro* com material proveniente de árvores adultas já foi reportada nalgumas das espécies mais importantes do género *Quercus* como *Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. suber*, *Q. cerris* e *Q. rubra* especialmente com material de origem em rebentamentos de toíça e rebentos adventícios e/ou acessórios (San-José *et al.*, 1988, 1990; Manzanera e Pardos, 1990; Romano *et al.*, 1992a; Chalupa, 1993; Evers *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1994; Romano, 1994; Sanchez *et al.*, 1996; Lorenzo *et al.*, 2001; Ostrolucká *et al.*, 2007).

Em conclusão, ao longo de mais de 25 anos de trabalhos relativos à micropropagação de carvalhos a partir de culturas de rebentos axilares é possível concluir a viabilidade da regeneração de todas as plantas, sendo mesmo possível o estabelecimento *in vitro* e a regeneração de genótipos de carvalhos com cerca de 300 anos (Sanchez *et al.*, 1996) (utilizando métodos de rejuvenescimento e culturas *in vitro* de explantes na horizontal), embora ainda não seja suficientemente eficiente para ser aplicada a uma escala comercial, uma vez que existem ainda algumas limitações na sua aplicação como: o efeito do genótipo, o declínio progressivo da proliferação de rebentos durante sucessivas subculturas/repicagens e a dificuldade em propagar material maduro de árvores selecionadas com pouca disponibilidade de rebentos novos de toíça e rebentos epicórmicos (Vieitez *et al.*, 2012).

2.2.1. Micropropagação em sobreiro

O primeiro trabalho em cultura de tecidos de sobreiro foi publicado em 1952 por Jacquiot que obteve *callus* a partir de culturas *in vitro* de tecido cambial. Contudo, só a partir da década de 1980 é que se retomaram os estudos *in vitro* nesta espécie, tendo Pardos, em 1981, feito uma primeira abordagem à micropropagação de *Quercus suber* tendo usado material de plantas jovens de um ano, em meio MS suplementado com BAP e NAA. Também em 1981, Bellarosa obteve culturas de rebentos axilares a partir de embriões (sem cotilédones) de sobreiro. Em ambos os casos obteve-se pouco sucesso na fase de enraizamento. Em 1988, Deidda *et al.* conseguiram regenerar plântulas a partir de rebentos axilares de jovens plantas (in Manzanera e Pardos, 1990; Carvalho, 1992; Romano e Martins-Loução, 1992; Romano *et al.*, 1992a; Romano, 1994).

O primeiro trabalho em que, para além de material juvenil também se utilizou material adulto com origem em árvores e toíças foi desenvolvido por Manzanera e Pardos e publicado em 1990, ao qual se seguiram outros trabalhos sobre a micropropagação a partir de sobreiros adultos (Carvalho, 1992; Romano e Martins-Loução, 1992; Romano *et al.*, 1992a; Romano, 1994). As metodologias utilizadas

nestes trabalhos para a iniciação de cultura *in vitro* a partir de material adulto de *Quercus suber* são expostas no quadro 1. Daqui em diante serão fundamentalmente focados aspetos da micropropagação de material de origem adulta, sobretudo na fase de iniciação e estabelecimento das culturas *in vitro* desenvolvidas pelos autores supramencionados neste parágrafo.

Quadro 1: Metodologia utilizada por diferentes autores para a iniciação de culturas de *Quercus suber* L. com origem em material com características maduras. Legenda: GA – gomos axilares, dH₂O – água destilada.

Referência	Proveniência do material de origem	Preparação da planta/material-mãe	Tipo de explante inicial e sua preparação	Desinfecção superficial dos explantes
Manzanera e Pardos, 1990	Segmentos de ramos colhidos em fevereiro de árvores com 75-115 anos	7 dias no escuro a 4°C. <i>Desinfecção superficial:</i> fernide (1 g/l) (24h) → ramos borrifados com BAP (100 mg/l)	Novos rebentos com alguns cm de comprimento desfolhados e as extremidades de corte revestidas de parafina	HgCl ₂ a 0,2% + algumas gotas de Tween20 (2 min) com agitação → CaCl ₂ a 2,44 g/l (10min) → ácido ascórbico a 1 g/l (10 min)
	Toiças de 30-40 anos	Tratados com BAP (100 mg/l) em setembro		
Carvalho, 1992	Segmentos de ramos lenhosos de árvores com cerca de 50 anos	Benlate (s.a. benomil) (2g/l) + lixívia comercial 5% (5% cloro ativo) (20 min) → água corrente	Gomos axilares com cerca de 2 cm	<ol style="list-style-type: none"> HgCl₂ a 0,1% (p/v) + 2/3 gotas de Tween20 (2 min) → dH₂O esterilizada (2/3x) → NaOCl (5%) (v/v) + 2/3 gotas de Tween20 (10min) → dH₂O esterilizada (2/3x) → [individualização GA] → NaOCl (5%) (v/v) + 2/3 gotas de Tween20 (10min) → dH₂O esterilizada (3x) HgCl₂ a 0,1% (p/v) + 2/3 gotas de Tween20 (2 min) → dH₂O esterilizada (2/3x) → Ca(ClO)₂ (5%) (p/v) + 2/3 gotas de Tween20 (10min) → dH₂O esterilizada (2/3x) → [individualização GA] → Ca(ClO)₂ (5%) (p/v) + 2/3 gotas de Tween20 (10min) → dH₂O esterilizada (3x)
		<i>Condições controladas de pré-acondicionamento para o abrolhamento:</i> Extremidade basal imersa em água destilada. Ramos aspergidos diariamente com água e semanalmente com BAP (100 mg/l). (25 °C +/- 5 °C, 16h fotoperíodo) (2-3 semanas)		
Romano e Martins-Loução, 1992	Segmentos de ramos de 40 cm colhidos ao longo de todo o ano de árvores adultas	Ramos desfolhados e armazenadas em sacos de plástico a 5 °C no escuro durante 3 semanas	Gomos axilares e terminais de novos rebentos desfolhados	<ol style="list-style-type: none"> Lixívia (5% cloro ativo) a 5% (v/v)+ Teepol a 0,01% (v/v) (15 min) Ca(ClO)₂ a 5% (p/v) (filtrado) + Teepol a 0,01% (v/v) (15 min) Cetrimida a 5% (p/v) + Teepol a 0,01% (v/v) (15 min) HgCl₂ a 0,1% (p/v) (1 min) → procedimento 1 <p>Todos os tratamentos foram seguidos de 3 lavagens com dH₂O esterilizada</p>
		<i>Desinfecção superficial:</i> Lixívia a 20% (v/v) e Teepol a 5% (v/v) (30 min) → Benlate (3 g/l) (1h)		
Romano et al., 1992a	Segmentos de ramos lenhificados de 40 cm de árvores maduras	3 semanas em sacos de plástico no escuro a 5°C.	Gomos axilares e terminais de novos rebentos com 4-5 cm de comprimento. As folhas foram removidas e deixou-se 5 mm do pedicelo	HgCl ₂ a 0,1% (2 min) → Lixívia a 5% + Tween20 a 0,01% (10 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada
		<i>Desinfecção superficial:</i> Lixívia a 10% (5% de cloro ativo) + Tween20 (2%) + Benlate (2g/l) (30 min)		
		<i>Condições controladas de pré-acondicionamento para o abrolhamento:</i> Borrifos com BAP (100 mg/l) nas estacas com as extremidades basais imersas em		

		água destilada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16h fotoperíodo) (15-20 dias)	
		Armazenados duas semanas a 5°C , no escuro.	
		Remoção das folhas e ápices. <i>Desinfecção superficial</i> : água corrente → imersão em lixívia (5% cloro ativo) a 20% (v/v) + Teepol a 2% (v/v) (30 min) → água corrente → imersão em Benlate (3 g/l) (30 min).	
		<i>Condições controladas de pré-acondicionamento para o abrolhamento</i> : Extremidade basal em água destilada (renovada diariamente). Borrifos diários com água, a cada 2 dias com Benlate (1 g/l), semanalmente com BAP (100 mg/l) ($25 \pm 5^\circ\text{C}$, 16h fotoperíodo) (15-20 dias)	
Romano, 1994	Segmentos de ramos de 40 cm, da zona média da copa de árvores adultas	Ramos sem tratamento ou condicionamento	Gomos apicais e segmentos nodais contendo um ou dois gomos axilares individualizados de novos rebentos com 2-4 cm (folhas removidas)
			<ol style="list-style-type: none"> 1. Lixívia (5% cloro ativo) a 5% (v/v) (15 min) 2. Lixívia (5% cloro ativo) a 5% (v/v) (30 min) 3. Lixívia (5% cloro ativo) a 10% (v/v) (15 min) 4. Lixívia (5% cloro ativo) a 10% (v/v) (30 min) 5. Hipoclorito de Cálcio a 10% (p/v) (15 min) 6. Hipoclorito de Cálcio a 10% (p/v) (30 min) 7. Etanol a 70% (v/v) (30s) → Lixívia (5% cloro ativo) a 10% (v/v) (15 min) 8. Etanol a 70% (v/v) (1 min) → Lixívia (5% cloro ativo) a 10% (v/v) (15 min) 9. Etanol a 70% (v/v) (1 min) → $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ a 10% (p/v) (15 min) 10. HgCl_2 a 0,1% (p/v) (1 min) → Lixívia (5% cloro ativo) a 10% (v/v) (15 min) <p>Foi adicionado Tween20 (0,01%, v/v) a todas as soluções com exceção do etanol</p> <p>Todos os tratamentos realizados com agitação durante a desinfecção, seguidos de 3 lavagens sucessivas com dH_2O esterilizada</p>

O material colhido de sobreiros adultos é relutante a desenvolver-se *in vitro*. Em qualquer um dos trabalhos expostos no quadro 1, só se conseguiram iniciar culturas *in vitro* após pré-condicionamento e tratamento do material de origem da planta-mãe, contribuindo ainda esta fase para o rejuvenescimento dos tecidos. Romano (1994), talvez o trabalho mais abrangente e detalhado relativamente à fase de iniciação e estabelecimento de culturas de rebentos *in vitro* a partir de material de sobreiros adultos, considerou impossível o estabelecimento deste tipo de material recolhido diretamente do campo, devido à elevada percentagem de explantes contaminados. Dos vários agentes de desinfeção que testou nenhum permitiu reduzir as contaminações para níveis aceitáveis, nem mesmo o cloreto de mercúrio (no método 10, de 95% de explantes contaminados passou para 20% quando os explantes provinham de material pré-condicionado). Para além disso, esta fase de pré-condicionamento permite desinfeções superficiais dos explantes mais leves levando a aumentos da viabilidade (Romano *et al.*, 1992a). Relativamente à exsudação de compostos fenólicos, os explantes de material recolhido diretamente do campo apresentam percentagens muito elevadas, sendo a viabilidade de crescimento baixa. Entre a exsudação de compostos fenólicos e a viabilidade de crescimento dos explantes pode-se considerar um efeito de dependência (Gonçalves e Rainho, 1992; Romano, 1994), em que os explantes não viáveis apresentam normalmente exsudação, embora o inverso não se verifique necessariamente, podendo isso estar relacionado com diferenças nas quantidades de compostos fenólicos exsudadas.

Estes problemas foram parcialmente solucionados quando os explantes são recolhidos de ramos previamente tratados e condicionados. Este período facilita a iniciação e o estabelecimento de explantes de sobreiro, contribuindo para a diminuição de contaminações e de exsudações de compostos fenólicos, através da redução dos níveis de fenóis pré-existentes nos explantes, e para o aumento da viabilidade de crescimento dos explantes que é relacionado por Romano (1994), com o rejuvenescimento induzido pela aplicação de BAP durante o abrolhamento dos rebentos no período de condicionamento.

Um efeito de sazonalidade pode ainda ser considerado, com maior exsudação de compostos fenólicos nos meses de outubro, novembro e dezembro e mínima em maio, sendo menor no verão. Este efeito pode ser ultrapassado através dos pré-condicionamentos e tratamentos referidos em cima, sendo possível instalar-se *in vitro* explantes provenientes de material adulto colhido em qualquer altura do ano (Romano e Martins-Loução, 1992; Romano *et al.*, 1992a; Romano, 1994).

No que diz respeito aos métodos de desinfeção superficial utilizados, Manzanera e Pardos (1990) consideraram o uso da lixívia na desinfeção do material de origem adulta inadequado tendo optado pelo cloreto de mercúrio (quadro 1) como substituto que, embora eficaz no controlo das contaminações, originou taxas de toxicidade elevadas, na ordem dos 50%. A evolução dos explantes de origem adulta foi mais lenta que o material de origem juvenil. Já Carvalho (1992) considerou o hipoclorito de sódio mais adequado para obtenção de culturas em condições assépticas, sendo economicamente menos oneroso e a sua preparação mais rápida do que o hipoclorito de cálcio, um resultado que contrasta com o obtido por Gonçalves e Rainho (1992) para explantes de origem em material juvenil.

Romano e Martins-Loução (1992) obtiveram os melhores resultados com o método de desinfeção 4 (quadro 1) composto por cloreto de mercúrio, Teepol e lixívia, método posteriormente utilizado por

Romano *et al.* (1992a). O método 3 revelou-se ineficaz no controlo das contaminações. Nos outros dois métodos testados, a incidência de contaminações rondou os 40%. O acastanhamento que, segundo os autores, se deve normalmente à oxidação dos tecidos pela exsudação de fenóis, variou com o processo de desinfecção utilizado e a data de colheita de material aumentando a ocorrência de tecidos oxidados com a eficiência de desinfecção.

Romano (1994), para aferir o método de desinfecção superficial dos explantes mais adequado, calculou um índice de eficiência de desinfecção que entrava em consideração com as percentagens de explantes não contaminados e de explantes viáveis (com crescimento). De todos os métodos de desinfecção que testou, os que apresentaram melhores índices de eficiência (culturas sem contaminações e viáveis) foram os métodos 9, 3, e 10. O método 10 apresentou o terceiro maior valor do índice, contudo, embora tenha sido o que melhor controlou as contaminações, foi responsável por uma baixa percentagem de viabilidade de crescimento, muito provavelmente associada à elevada toxicidade deste agente. Tendo tudo isto em conta e as dificuldades na eliminação do cloreto de mercúrio, a autora deixou de usar este método. O método 9 foi, segundo o índice, o método mais eficiente, logo seguido pelo método 3. Por motivos de ordem prática, isto é, por apenas envolver um agente de desinfecção (Lixívia com 5% cloro ativo numa concentração a 10%, v/v), a autora acabou por eleger o método 3 para o seu trabalho.

De forma geral, analisando particularmente os agentes de desinfecção, a autora concluiu ainda que foi mais vantajoso aumentar a concentração do que o tempo de exposição ao hipoclorito de sódio para controlar as contaminações e manter bons níveis de viabilidade. Tempos de desinfecção prolongados podem comprometer a viabilidade dos explantes. O hipoclorito de cálcio foi mais efetivo que o hipoclorito de sódio no controlo das contaminações, na concentração e com a duração em que se obtiveram os melhores resultados para o hipoclorito de sódio. Contudo, mantendo a mesma concentração e aumentando para o dobro o tempo de exposição dos explantes ao hipoclorito de cálcio resultou, neste trabalho, numa também quase duplicação tanto das contaminações como da viabilidade, sendo a exsudação muito semelhante. Com o etanol, a autora pretendia não só tirar partido do seu efeito bactericida mas principalmente da sua ação de dissolução da camada epicuticular dos tecidos para melhor penetração da solução desinfetante do passo seguinte. No entanto, apesar do aumento da viabilidade para cerca de 100%, as percentagens de contaminações foram muito elevadas (cerca de 80%). A exsudação de compostos fenólicos aumentou quando aumentou o tempo de exposição ao etanol.

Ainda sobre as contaminações, alguns explantes aparentemente não contaminados no final do período de estabelecimento, manifestaram contaminações durante os ciclos posteriores de multiplicação, indicando desta forma a presença de contaminações endógenas, tendo as desinfecções superficiais pouco efeito sobre estas (Romano, 1994).

Quanto aos meios de cultura, todos os autores aqui citados são unânimes em considerar os meios basais de baixa concentração em sais mais adequados para a cultura de rebentos de origem adulta de *Quercus suber*. Entre esses meios os mais utilizados na micropropagação deste tipo de material são o GD e o WPM. Manzanera e Pardos (1990), contudo, obtiveram as melhores taxas de abrolhamento nos explantes *in vitro*, de origem adulta, com o meio Sommer, não encontrando diferenças

significativas, relativamente à composição mineral de sete meios testados, no abrolhamento e comprimento de novos rebentos de material juvenil. Quando o meio MS, com elevada concentração salina, foi utilizado, a dormência dos gomos não era quebrada ou os gomos desenvolviam-se muito pouco, ocorrendo fenómenos de hiperidricidade nos explantes (possivelmente devido à presença de nitrato de amónio no meio), ocorrendo ainda acastanhamento do meio devido à exsudação de fenóis (Manzanera e Pardos, 1990; Carvalho, 1992; Romano e Martins-Loução, 1992; Romano *et al.*, 1992a; Romano, 1994). Mais recentemente, El-Kbiach *et al.* (2004), com material de origem juvenil (plantas de 3 meses), obtiveram os melhores resultados na indução de *callus* e na multiplicação de rebentos com um meio combinado, aproveitando os micronutrientes do meio MS e os macronutrientes do meio WPM. Os meios são muitas vezes suplementados com reguladores de crescimento, sendo o BAP apontado como o mais eficiente, com boas percentagens de explantes com resposta de crescimento e maior crescimento, variando a sua concentração ótima de 0,1 a 1 mg/l (Manzanera e Pardos, 1990; Romano *et al.*, 1992a; Romano, 1994). Foram também ensaiadas associações como BAP/NAA, BAP/IBA e BAP/IAA pelos mesmos autores, durante a proliferação das culturas, conseguindo, por vezes, obter melhores taxas de multiplicação. Romano *et al.* (1992a) testaram ainda um sistema de cultura de dupla-fase, verificando que tanto o alongamento como o número de rebentos aumentavam devido a taxas elevadas e uniformes da absorção de BAP e nutrientes não apenas pelo caule mas também pelas folhas basais em contacto com a camada líquida do meio.

Para além de reguladores de crescimento também se pode adicionar ao meio antibióticos. Contudo, Romano (1994), não obteve o efeito bactericida que pretendia mas sim bacteriostático e com consequências negativas sobre o crescimento dos explantes (inibidores de crescimento), utilizando os antibióticos tetraciclina, rifampicina e cloranfenicol (individualmente e na concentração de 1 mg/l), tendo por isso optado por abandonar esta metodologia.

Romano (1994) acrescentou também ao meio basal carvão ativado, verificando uma diminuição da sobrevivência e crescimento dos explantes de material adulto de *Q. suber*, enquanto El-Kbiach *et al.* (2004) documentou um efeito inibidor deste suplemento sobre o abrolhamento em explantes da mesma espécie, mas de origem juvenil. Estes últimos autores, ainda sobre os meios de cultura, consideraram que concentrações elevadas de agar (0,9%) também diminuía o abrolhamento de gomos.

Os problemas de oxidação e autointoxicação dos explantes pela exsudação de compostos fenólicos foram resolvidos através de repicagens dos explantes para meio fresco, evitando problemas de sazonalidade, sendo um dos fatores que torna possível a iniciação da cultura *in vitro* com material colhido ao longo de todo ano (Romano e Martins-Loução, 1992; Romano, 1994).

Ainda, subculturas sucessivas podem induzir o rejuvenescimento de explantes de origem adulta, tornando menos difíceis as restantes fases do processo de regeneração de genótipos selecionados (Romano *et al.*, 1992a).

O período de estabelecimento indicado nalgumas destas publicações é de quatro semanas, podendo-se atingir taxas de proliferação de quatro por explante, transferidos para meio fresco de quatro em quatro semanas (Romano e Martins-Loução, 1992; Romano, 1994).

Estes autores conseguiram assim, através de técnicas de rejuvenescimento, propagar e regenerar plântulas *in vitro* a partir de material de origem adulta (Manzanera e Pardos, 1990; Romano *et al.*, 1992a; Romano e Martins-Loução, 1992; Romano, 1994).

3. Biologia floral e reprodutiva do sobreiro

O conhecimento da biologia floral de uma espécie é fundamental para a realização de polinizações controladas. Os programas de melhoramento dependem em grande parte da produção de semente nos pomares de semente e cruzamentos (confirmado através de marcadores moleculares) para avaliar parâmetros genéticos (Varela e Valdivieso, 1996).

De seguida procede-se à descrição morfológica das estruturas reprodutivas e dos frutos, à apresentação das fases fenológicas das flores, frutos e principais fases do desenvolvimento vegetativo e reverse o comportamento reprodutivo do sobreiro.

3.1. Morfologia e anatomia das estruturas reprodutivas e dos frutos

O sobreiro é uma espécie monóica apresentando flores unissexuais. As flores masculinas são constituídas por um perianto de 4-6 tépalas (coloração carminada ou verde ou apenas rosadas na margem), que envolve 4-12 estames, formados por filetes de 2 a 5 mm que suportam as anteras (volumosas, pubescentes e de epiderme muito cutinizada) compostas por 2 lóculos, no seu estado maduro (onde se encontram os sacos polínicos), um de cada lado do conectivo (que forma um sulco evidente). As flores, em números entre os 10 e 36, estão agrupadas ao longo de amentilhos delgados, com um comprimento médio de 5 cm (variando entre 3 e 7 cm), existindo uma correlação entre o número de flores e o comprimento do amentilho. Estas inflorescências encontram-se pendentes da axila das folhas ou de escamas estipulares, emergindo, sozinhas ou em grupo (1 a 5 amentilhos), de gomos reprodutivos (só masculinos) ou mistos (reprodutivos e vegetativos), na extremidade do lançamento do crescimento do ano anterior (normalmente gomos reprodutivos) ou, mais raramente, de gomos situados na base dos lançamentos do próprio ano (mistos) (Pereira Coutinho, 1939; Natividade, 1950; Vasconcellos, 1969; Sá, 1995; Varela e Valdivieso, 1996; Boavida *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999; Patrício, 2004; Gómez-Casero *et al.*, 2004). Os grãos de pólen, binucleados durante a antese, têm uma forma trilobada com cerca de 32 µm (Feijó *et al.*, 1999).

As flores femininas estão organizadas em curtas espigas de 2-5 flores (raramente mais; variável entre indivíduos), situadas na axila das folhas da parte média ou da extremidade do lançamento anual. Normalmente 3 estiletos (podendo chegar aos 6) emergem de escamas imbricadas (cúpula escamosa proveniente da união de duas bractéolas laterais) (Pereira Coutinho, 1936; Franco, 1971; Sá, 1995; Boavida *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999). Os estigmas são do tipo “seco”, sem células papiláceas, mas com células recetivas à superfície concentrando-se em sulcos distintos (Heslop-Harrison e Shivanna 1977 in Feijó *et al.*, 1999; Boavida *et al.*, 1999). O gineceu de 2-3, raramente 6, carpelos unidos, apresenta um ovário ínfero trilobado, com dois óvulos em cada lóculo. Normalmente só um óvulo evolui após fecundação pelo que o fruto é, na maioria das vezes, monospérmico (Pereira Coutinho, 1939; Natividade, 1950; Vasconcellos, 1969; Franco, 1971; Carvalho *et al.*, 1999).

Os estádios iniciais de diferenciação das estruturas femininas são difíceis de reconhecer pois são muito semelhantes às dos gomos vegetativos, uma vez que as inflorescências femininas surgem em

gomos mistos (Sá, 1995; Varela e Valdivieso, 1996; Boavida *et al.*, 1999). Já num estágio de maior diferenciação as flores são bastante pequenas, aproximadamente de 1-3 mm de comprimento, sem qualquer tipo de conspicuidade quer na forma quer na cor (Sá, 1995; Varela e Valdivieso, 1996; Boavida *et al.*, 1999).

É ainda possível e por vezes frequente, a ocorrência de flores hermafroditas, especialmente nas florações atípicas em agosto e setembro, embora já tenham sido observadas também de maio a junho e em julho entre as espigas femininas, sendo ainda possível sua ocorrência entre as flores masculinas dos amentilhos (Natividade, 1950; Varela, 1994; Varela e Valdivieso, 1996; Boavida *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999). O aparecimento destas flores pode ser consequência de condições ambientais invulgares (Feijó *et al.*, 1999).

O fruto, denominado glande, é indeiscente, seco e monospérmico, com pericarpo delgado coriáceo. É envolvido, em parte, por uma cúpula lenhosa, revestida por escamas de comprimento, orientação e forma variadas, aberta em forma de taça e que se liga à base da glande, podendo envolver até dois terços da altura da glande madura. A forma e dimensões do fruto podem variar bastante entre indivíduos, podendo o eixo maior da glande atingir entre 5 a pouco mais de 1 cm e com valores médios de largura na ordem de 1,6 cm. A semente contém em regra 2 cotilédones e 1 embrião, raramente 3 ou 4 cotilédones, por vezes 3 ou 4 embriões (Pereira Coutinho, 1939; Natividade, 1950; Vasconcellos, 1969; Sá, 2005).

3.2. Fenologia do sobreiro

A fenologia estuda os eventos do ciclo de vida de um ser vivo que se repetem periodicamente sobre a influência de fatores climáticos. Desta forma o início e a duração dos eventos biológicos nas plantas, como o crescimento vegetativo e floração, são influenciados por variações sazonais e intra-anuais do clima numa interação entre genótipo e ambiente (Varela e Valdivieso, 2011).

Os estudos fenológicos são uma ferramenta essencial para a realização de programas de melhoramento genético baseados em cruzamentos controlados. A variabilidade do comportamento fenológico contribui para a sobrevivência, adaptação e boa saúde dos povoamentos, aumentando a resiliência das populações. Permite, a nível individual, uma maior maleabilidade às adversidades climáticas, pragas e doenças, entre outros, enquanto aumenta o potencial uso de condições climáticas favoráveis e singulares (Varela e Valdivieso, 2011).

Em seguida descrevem-se as fases fenológicas definidas por Varela e Valdivieso (1996 e 2011) e Sá (1995), para o desenvolvimento vegetativo, para as florações femininas e masculinas e para a frutificação.

Para os registos fenológicos vegetativos Varela e Valdivieso (2011) consideraram seis estádios diferentes, representativos da evolução desde os gomos em dormência até à maturação foliar dos lançamentos abrolhados dos gomos:

- Dormência (gomos dormentes completamente envolvidos por escamas protetoras);
- Gomo lanudo (fim do intumescimento dos gomos com as escamas suavemente coloradas com algumas partes densamente cobertas de pelos);
- Folhas visíveis (emergência das primeiras folhas);

- Orelha-de-rato (primeiras folhas separadas do eixo cerca de 10 mm acima das escamas do gomo);
- Folha expandida mas não atempada (primeiras folhas completamente expandidas);
- Folha atempada (folhas maduras).

Quanto às florações masculinas Varela e Valdivieso (1996) descrevem a seguinte sequência fenológica: Am - gomo arredondado e acastanhado completamente revestido por escamas protetoras; Bm - tumescência e alongamento do gomo com abertura das escamas; Cm - emergência do amentilho de forma arredondada devido à apertada aglomeração das flores; Dm - alongamento do amentilho; D2m - metade das flores estão individualizadas e o amentilho torna-se pendente (processo da base para a extremidade); Em - as anteras tornam-se individualizadas com tonalidade verde amarelada; Fm - começa a libertação do pólen em menos de metade das flores do amentilho; F2m - antese completa: a dispersão do pólen ocorre em aproximadamente metade das flores do amentilho. Algumas anteras podem eventualmente libertar todo o pólen, perdendo assim o seu carácter amarelado; Gm - devido à desidratação a grande maioria das anteras estão acastanhadas, em consequência da libertação de todo pólen; Hm - todas as anteras apresentam uma cor castanha escura e a queda do amentilho é eminente

Quanto à floração feminina, as mesmas autoras (Varela e Valdivieso, 1996) definiram a seguinte sequência de estádios fenológicos: Af - gomo misto acastanhado completamente revestido por escamas protetoras; Bf - tumescência e alongamento do gomo com abertura das escamas; Cf - emergência das primeiras folhas; Df - aparecimento de gomos axilares reprodutivos com escamas verdes, Ef - alongamento do eixo da espiga e emergência do primeiro par de flores. Pode ocorrer o aparecimento dos estigmas neste estado inicial; Ff - as flores apresentam estigmas distintos, eretos e amarelos com pontas curvas rosadas/acastanhadas; F2f - plena recetividade. Mais de 50% das flores da espiga apresentam estigmas intumescidos em posição nitidamente divergente, de aspeto amarelo brilhante e viscoso; Gf - perda de recetividade em alguns estigmas que se tornam opacos castanho amarelados; Hf - todos os estigmas perdem a recetividade exibindo uma cor castanha escura.

Relativamente à evolução fenológica dos frutos, Sá (1995) considerou a seguinte sequência: 1 - fruto completamente envolvido por uma cúpula escamosa fechada, frequentemente com estigmas secos no plano distal, 2 - abertura da cúpula e aparecimento da ponta verde do fruto no plano distal, 3 - fruto verde já emergiu notoriamente da cúpula, 4 - fruto apresenta um tamanho praticamente definitivo mas ainda com cor verde, 5 - fruto maduro de cor castanha e tamanho definitivo.

3.3. Comportamento Reprodutivo do Sobreiro

Em termos de melhoramento e conservação de recursos genéticos, o conhecimento do sistema e comportamento reprodutivo de uma espécie fornece um conjunto de informações, que influenciam decisivamente o tipo de decisões a tomar quando nos enquadrarmos no âmbito destes programas (Sá, 1995). Todos os trabalhos dedicados ao estudo e compreensão do comportamento reprodutivo do sobreiro são unânimes em considerá-lo complexo, especialmente no que se refere à biologia floral e à frutificação.

Os sobreiros apresentam, relativamente ao comportamento reprodutivo, variabilidade individual elevada, grande variabilidade entre indivíduos dentro da mesma população, e no mesmo indivíduo ao

nível dos anos (Elena-Rossello *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 1994; Sá, 1995; Cabral, 1996; Reforço, 1997; Carvalho *et al.*, 1999; Moreira, 2005; Gómez-Casero *et al.*, 2007).

Esta espécie apresenta uma concentração dos fenómenos de crescimento e reprodução nas estações mais favoráveis, ou seja quando as temperaturas são mais elevadas e existe água em abundância no solo (Cabral, 1996). Em locais com pouca disponibilidade de água a época de crescimento está limitada a curtos períodos com condições de temperatura e humidade favoráveis, representando o aumento do período de seca, devido a primaveras mais quentes e secas, uma restrição ao crescimento vegetativo (Gómez-Casero *et al.*, 2007; Pinto, 2013).

Assim, a época principal de floração acontece maioritariamente na primavera podendo ocorrer de abril a julho conforme as regiões e as condições edafoclimáticas do local (Corti *et al.*, 1955; Varela, 1994; Cabral, 1996; Carvalho *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999; Díaz-Fernández *et al.*, 2004; Patrício, 2004; Gómez-Casero *et al.*, 2007; Varela *et al.*, 2008). Em Portugal a floração inicia-se normalmente em abril/maio, em regiões do centro sul e sul do país podendo estender-se até junho/julho em algumas regiões no norte do país, ocorrendo distâncias fenológicas de mais de dois meses (Cabral, 1996; Patrício, 2004; Varela, 1994; Carvalho *et al.*, 1999; Varela *et al.*, 2008).

A floração numa população de sobreiros num determinado ano não é simultânea, variando o seu início conforme as condições climáticas nesse ano e com o genótipo de cada indivíduo podendo variar, de algumas semanas (Varela, 1994; Sá, 1995). As variações na distribuição temporal da fenologia ocorrem também de local para local, entre populações (Varela, 1994; Gómez-Casero *et al.*, 2007). Contudo, o comportamento de um indivíduo face aos restantes, no que diz respeito à precocidade ou atraso na floração (tanto masculina como feminina), mantém-se constante de ano para ano (Sá, 1995).

O sobreiro é uma espécie que apresenta dicogamia, surgindo as inflorescências femininas mais tarde que as masculinas, uma vez que as primeiras se encontram na axila de folhas do lançamento do ano, enquanto os amentilhos, abroham juntamente ou até antes desses lançamentos (gomos reprodutivos nos ramos do ano anterior), ou na base dos novos lançamentos (gomos mistos) conseguindo habitualmente ter um desenvolvimento fenológico uns dias mais avançado (cerca de uma semana) relativamente às espigas femininas (Oliveira *et al.*, 1994; Cabral, 1996; Varela e Valdivieso, 1996; Boavida *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999), um comportamento designado de protandria (Gómez-Casero *et al.*, 2007). Por esta razão e também por diferenças no ritmo de desenvolvimento fenológico dos dois tipos de inflorescências, ocorrem pequenos desfasamentos temporais entre a máxima libertação do pólen e a plena recetividade dos estigmas ao nível da árvore podendo, por vezes, ser verificado a nível da parcela (Sá, 1995; Varela e Valdivieso, 1996; Carvalho *et al.*, 1999).

O sobreiro exhibe padrões irregulares de floração e frutificação (Natividade, 1950; Corti, 1955). Numa parcela existe um pequeno grupo de árvores que, ao longo dos anos, contribui sempre para o processo reprodutivo, produzindo constantemente amentilhos e/ou espigas, embora em graus de abundância variados (Elena-Rossello *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 1999). Elena-Rossello *et al.* (1993) chegaram mesmo a considerar 4 tipos diferentes de árvores consoante o investimento nas estruturas reprodutivas e vegetativas: árvores masculinas (produzem poucas flores femininas e nunca produzem fruto), árvores femininas (produzem poucas flores masculinas ou os amentilhos abortam antes de produzirem pólen), árvores vegetativas (ausência de inflorescências dos dois géneros e com grande produção de biomassa

foliar), árvores andrógenas (produzem os dois tipos de inflorescências e com grandes produções de fruto).

As árvores só começam a frutificar por volta dos 15-30 anos (Natividade, 1950; Varela, 1994) sendo esta alternante com anos de safra seguidos de vários anos de contra-safra. Natividade (1950) considera que em 10 anos há no máximo 3 safras abundantes normalmente coincidentes com as primaveras de maior pluviosidade. Padrões semelhantes de produção de fruto foram relatados por Moreira (2005) e Pons e Pausas (2012).

3.3.1 *Floração masculina*

O *Q. suber*, entre os *Quercus* na Península Ibérica, tem das mais altas exigências em calor para induzir a floração masculina (Jato *et al.*, 2002).

Embora distribuídos de forma mais ou menos homogênea pela copa da árvore, os amentilhos começam por surgir no terço superior da copa progredindo depois para as zonas mais basais verificando-se assim um desfasamento temporal de alguns dias entre as inflorescências do topo e da base da copa, sendo este desfasamento também verificado nas inflorescências femininas (Sá, 1995; Cabral, 1996).

Ao nível da parcela, podem ocorrer amentilhos em vários estádios fenológicos (atrasados ou avançados) relativamente à maioria da população (Carvalho *et al.*, 1999).

A libertação de pólen numa parcela pode assim ocorrer em períodos diferentes, podendo esta diferença ascender a mais de um mês entre o final do período de libertação de pólen de uma árvore e o início da libertação de pólen de outra, sem diferenças edafoclimáticas, o que sugere variabilidade genética entre as árvores (Varela, 1994; Moreira, 2005).

As anteras não entram em deiscência simultaneamente, assim como as flores num amentilho não florescem ao mesmo tempo, ocorrendo normalmente da base para o topo da inflorescência. Desta forma a libertação de pólen num amentilho dura alguns dias, sendo a sua duração influenciada pelas condições climáticas. Contudo, no que toca às diferenças de estádios entre flores no mesmo eixo floral, as flores masculinas costumam apresentar um desenvolvimento mais homogêneo do que as flores femininas (Varela e Valdivieso, 1996; Gómez-Casero *et al.*, 2007).

O sobreiro é uma espécie anemófila estando a dispersão do pólen condicionada por fatores climáticos como a precipitação, a humidade relativa, a insolação, a temperatura e intensidade do vento durante a antese (Jato *et al.*, 2002, 2007; Gómez-Casero *et al.*, 2004).

A quantidade de pólen disponível pode ser afetada por irregularidades na floração masculina, expressada pelo grau de abundância de amentilhos variável de ano para ano, num indivíduo, e pelo número reduzido de árvores que participa no processo reprodutivo, sendo a dinâmica genética das populações de espécies de polinização anemófila fortemente condicionada pela quantidade relativa de floração (masculina e feminina) e frutificação dos indivíduos. A quantificação da produção é assim utilizada como um indicador da contribuição potencial dos vários indivíduos para a próxima geração e consequentemente para a arquitetura genética da população (Varela, 1994; Carvalho *et al.*, 1999).

Carvalho *et al.* (1999), estudando durante três anos uma população em Trás-os-Montes, consideraram que a evolução das flores masculinas de um estádio fenológico para o seguinte ocorre num período médio de 7 dias, havendo a possibilidade de encontrar na mesma árvore e na parcela,

flores em diferentes fases de desenvolvimento. Estudos feitos num povoamento na Península de Setúbal registaram-se períodos aproximados de quatro a cinco semanas entre o aparecimento dos primeiros vestígios de floração masculina (intumescimento dos gomos e primeiras emergências de amentilhos) e a plena libertação de pólen, na maioria dos indivíduos da parcela, apresentando a maioria das árvores estudadas irregularidades na duração de cada fase fenológica (Sá, 1995; Reforço, 1997; Moreira, 2005).

Quedas acentuadas nas temperaturas mínimas, com ocorrência de geadas no início da primavera podem levar à interrupção do desenvolvimento dos amentilhos, afetando drasticamente a quantidade de pólen produzido o que, em última análise, pode afetar a produção de frutos e contribuir dessa forma para as variações inter-anuais na produção de fruto (García-Mozo *et al.*, 2001; Gómez-Casero *et al.*, 2007).

3.3.2 *Floração feminina*

O aparecimento das flores femininas está associado aos novos crescimentos vegetativos (Natividade, 1950; Oliveira *et al.*, 1994; Varela, 1994; Varela e Valdivieso, 1996; Boavida *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 1999), ocorrendo principalmente nas zonas mais expostas da copa (Carvalho *et al.*, 1999).

A nível das espigas, são registadas diferenças na evolução das flores femininas ao longo do eixo floral, podendo mesmo haver uma diferença de até 3 fases fenológicas entre as flores na mesma espiga. Normalmente a espiga apresenta um gradiente de crescimento da base para a extremidade, encontrando-se as flores basais fenologicamente mais avançadas (Varela e Valdivieso, 1996). Estas últimas têm então maior probabilidade de maturar, uma vez que é vulgar apenas algumas flores da espiga atingirem a maturidade (Sá, 1995; Reforço, 1997).

O período de recetividade das flores femininas pode durar 5/6 dias, após o qual as células recetivas se tornam necróticas e os estigmas acastanhados (Boavida *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999).

A evolução da floração feminina pode ser bastante irregular. Estas irregularidades podem verificar-se tanto na data de iniciação da floração (que pode variar de ano para ano às vezes até um mês) como na duração de cada estágio fenológico (de semanas a meses), comportamento muitas vezes relacionado com as condições meteorológicas (Carvalho *et al.*, 1999; Díaz-Fernández *et al.*, 2004; Patrício, 2004; Gómez-Casero *et al.*, 2007). Ainda assim, Carvalho *et al.* (1999), no mesmo estudo referido atrás para a duração média dos estádios fenológicos das flores masculinas, consideraram para as flores femininas que, em média, cada estágio fenológico dura cerca de 15 dias, embora com comportamento bastante irregular, enquanto Gómez-Casero *et al.* (2007) registaram um desenvolvimento inicial lento seguido por alterações rápidas durante o período de floração, com um abrandamento nas fases finais do desenvolvimento fenológico das flores femininas.

Apesar de atrasos na floração em alguns anos, o desenvolvimento das flores e frutos, têm uma certa capacidade de recuperação, de tal forma que os frutos surgem mais ou menos nas mesmas datas (Reforço, 1997; Carvalho *et al.*, 1999).

Durante a evolução das flores femininas podem-se registar períodos de abscisão precoce sendo a sua percentagem especialmente acentuada na fase da fecundação (Corti, 1955; Carvalho *et al.*, 1999).

Segundo Carvalho *et al.* (1999) o estágio da flor feminina mais sensível é o Gf, ocorrendo paragens do desenvolvimento das flores nas fases F2f e Hf.

3.3.3. *Florações atípicas*

Novos surtos de floração (tanto masculina como feminina) poderão ocorrer durante o ano, embora de forma esporádica, apenas em alguns anos e num reduzido número de indivíduos, não podendo ser considerada uma característica geral da espécie (Natividade, 1950; Corti, 1955; Elena-Rossello *et al.*, 1993; Varela, 1994; Sá, 1995; Boavida *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999; Díaz-Fernández *et al.*, 2004; Patrício, 2004; Gómez-Casero *et al.*, 2007). Segundo Feijó *et al.*, (1999), a diferenciação dos primórdios florais acontece muito cedo, alguns meses após a floração primaveril, estando estruturalmente maduras antes do início da dormência em outubro. Isto poderá dar ao carvalho uma oportunidade alternativa de reprodução sexuada num ambiente em que a floração de primavera falhe. O impacto deste tipo de floração na produção de fruto irá depender do “timing” do evento em relação à extensão da época de crescimento e com o esforço reprodutivo favorecendo um ou outro género (Feijó *et al.*, 1999).

Os períodos de floração, fora da época principal, mais comuns na bibliografia são no início do verão (em finais junho, em julho e por vezes em agosto) (Varela, 1994; Sá, 1995; Feijó *et al.*, 1999; Patrício, 2004) no outono (sobretudo em outubro, mas também em finais de novembro e em dezembro) (Corti, 1955; Carvalho *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999; Gómez-Casero *et al.*, 2007) e, mais raramente no início do inverno (finais de dezembro e início de janeiro) (Corti, 1955; Varela, 1994). Contudo nestas datas nem sempre ocorrem, simultaneamente ou próximas no tempo, florações dos dois géneros. No verão (mês de julho o mais referido) está registado sobretudo o aparecimento de flores femininas. Durante o outono (mês de outubro o mais referido) o mais frequente é o aparecimento de flores masculinas assim como no início do inverno.

Florações femininas sem florações masculinas e vice-versa fora da época principal de floração na primavera, parece ser uma situação vulgar nesta espécie, desconhecendo-se qual o seu papel fisiológico e evolutivo (Corti, 1955; Varela, 1994; Sá, 1995; Feijó *et al.*, 1999; Díaz-Fernández *et al.*, 2004). A ocorrência de flores femininas que prosseguem um desenvolvimento para fruto na ausência de pólen é um dos pontos enigmáticos que merece ser estudado (Varela, 1994; Sá, 1995). Um estudo preliminar publicado por Patrício (2004) fez supor que, eventualmente, esta espécie possa usufruir de capacidades apomíticas, tendo sido obtidos frutos de flores devidamente isoladas mas sem confirmação genética através da germinação.

Muitas vezes, juntamente com estes episódios atípicos de floração, surgem flores hermafroditas (Natividade, 1950; Feijó *et al.*, 1999). Contudo, a ocorrência deste tipo de flores já foi documentada na primavera (a principal época de floração) com uma significância considerável, o que pode levantar alguns problemas no caso de se querer realizar cruzamentos controlados (Varela, 1994; Varela e Valdivieso, 1996).

Alguns fatores climáticos são apontados na tentativa de explicar a ocorrência involuntária destas florações após o principal período de floração na primavera como verões húmidos e temperaturas mais baixas na primavera que levam ao prolongamento da atividade vegetativa ou uma recuperação no outono, com temperaturas amenas e precipitações mais elevadas, após o stress causado por um

período seca no verão (Sá, 1995; Carvalho *et al.*, 1999; Díaz-Fernández *et al.*, 2004, Gómez-Casero *et al.*, 2007).

O papel destas florações fora de época para o perfil reprodutivo da espécie continua um mistério e requer mais investigação (Varela, 1994).

3.3.4. Frutificação

O sobreiro pode apresentar maturação do fruto tanto anual como bienal (Natividade, 1950; Corti, 1955, Elena-Rossello *et al.*, 1993; Díaz-Fernández *et al.*, 2004; Vinagre *et al.*, 2005; Pons e Pausas, 2012). Natividade (1950), sobre a maturação do fruto, considera três camadas: o bastão (em setembro/outubro, provenientes de flores do ciclo vegetativo anterior com interrupção do crescimento no inverno), a lande (em novembro/dezembro provenientes da mais recente floração primaveril) e o landisco (em janeiro/fevereiro, originários de fecundações tardias em julho e agosto). A produção de frutos de maturação bienal depende da quantidade de flores produzidas e das condições em que decorreu a sua fecundação. A lande é considerada a mais abundante e valiosa. Já o landisco é caracterizado por ser um fruto miúdo, cuja evolução é afetada pelo frio e que nem sempre chegam à maturação. Natividade (1950) justifica assim estas diferentes épocas de maturação com o muito prolongado período de floração, considerada mesmo subcontínua (Pereira Coutinho, 1936, 1939; Natividade, 1950; Feijó *et al.*, 1999), e que pode ser explicada pela descontinuidade do crescimento vegetativo durante o ciclo anual, que se manifesta por períodos alternados de renova e repouso.

Como atrás referido, muitos estudos confirmam florações fora da época principal, com aspeto aparentemente normal. Contudo a formação e/ou maturação de frutos que proviriam destas florações não é documentada na maioria deles, quer por falta de acompanhamento, quer por incredulidade na polinização, uma vez que apenas ocorre floração de estruturas reprodutivas femininas (também na ausência de pólen de outras espécies compatíveis), ou ainda por terem assistido à interrupção prematura do desenvolvimento das estruturas reprodutivas, com morte e abscisão de frutos antes de chegarem à maturação completa, devido a diversos fatores (fisiológicos, climáticos ou bióticos).

Corti (1955), não tendo encontrado evidências de que estas florações fora da época principal chegassem à maturação, propôs, para explicar as diferentes épocas de maturação do fruto, um controlo fisiológico ou genético, após a polinização, por parte das estruturas reprodutivas e da planta-mãe, com a capacidade de suspender, por maiores ou menores períodos de tempo, e retomar a evolução fenológica/ontogenética das flores primaveris, conforme o biótipo, inserido em determinadas condições edafoclimáticas. Segundo este autor os biótipos bienais encontram-se sobretudo nas zonas marginais de distribuição da espécie com condições edafoclimáticas mais extremas e desfavoráveis, estando associados a períodos vegetativos curtos. Elena-Rossello *et al.* (1993), sugeriu um padrão intermédio onde populações em climas mais amenos apresentariam sobretudo um padrão de maturação anual de floração contínua e as populações mais a norte, com climas mais frios e com períodos vegetativos consequentemente menores, teriam assim um padrão de maturação bienal, definindo-se portanto uma estratégia ecológica de adaptação ao clima Mediterrâneo.

Em estudos mais recentes tem-se vindo a dar uma importância cada vez maior às condições climáticas como fatores com relevante influência tanto sobre o tipo de maturação (anual ou bienal) como sobre o volume de produção, pondo-se cada vez mais de parte a hipótese das florações em

épocas diferentes do ciclo vegetativo estarem na origem dos diferentes ciclos de maturação. Nesta perspetiva, estas características seriam reguladas por fatores climáticos anuais que influenciam a data e duração dos principais eventos fenológicos (na primavera), apresentando os indivíduos com florações tardias, flores tendencialmente mais quiescentes (Díaz-Fernández *et al.*, 2004) sendo ainda possível considerar-se um efeito de interação entre os dois tipos maturação, em que condições que afetam negativamente a produção anual podem ser benéficas para a produção bienal (e vice-versa) existindo um efeito de compensação ao nível dos ramos (Pons e Pausas, 2012). Segundo estes últimos autores, a capacidade de modelar o padrão de produção de fruto num determinado ano de acordo com as condições climáticas, pode ser considerada um exemplo de plasticidade fenotípica para fazer face a condições climáticas incertas.

Em Portugal o padrão de frutificação dominante é o anual, tendo os frutos de maturação bienal pouca influência no comportamento reprodutivo da espécie, dado que na maioria dos casos a quantidade de produção deste tipo de frutos é considerada insignificante, registando-se quedas durante a primavera e no verão (Varela, 1994; Sá, 1995; Carvalho *et al.*, 1999). São contudo encontrados, durante o alargado período de frutificação do sobreiro, frutos em diferentes estados de maturação entre árvores, a nível dos ramos numa árvore e mesmo a nível da espiga (Sá, 1995). Já a queda dos frutos maduros, a nível da árvore, pode ocorrer em poucos dias ou durar várias semanas, mantendo-se os frutos maduros na copa, caindo gradualmente (Reforço, 1997).

Relativamente ao aspeto morfológico, das estruturas reprodutivas de maturação bienal, quando retomam o crescimento em abril, passam de uma cor acastanhada a um verde-claro ou rosa escuro, não parecendo este aspeto ter paralelo com nenhuma das fases do desenvolvimento dos frutos de maturação de um ano (Varela, 1994).

No sobreiro verificou-se que uma floração abundante não é condição suficiente para uma frutificação abundante, registando-se queda de flores femininas e elevada abscisão de frutos imaturos (Varela, 1994; Sá, 1995; Reforço, 1997; Carvalho *et al.*, 1999). Sá (1995) chegou a uma percentagem de cerca de 80% de quedas, entre o número inicial de flores e o número de frutos que alcançaram a maturação, num ano de contra-safra. Este conhecimento é importante quando se pretende saber se a simples contagem do número total de indivíduos (censo) é suficiente para o sucesso de um programa de melhoramento genético. Uma estimativa fidedigna da produção efetiva num determinado ano pode ser feita através da observação da abundância de frutos imaturos em meados de setembro (Sá, 1995; Reforço, 1997).

A produção de frutos está, desta forma, dependente da quantidade de flores femininas produzidas (influenciada por fatores genéticos), da capacidade de fecundação, de fatores fisiológicos e de condições climáticas, como a temperatura e a precipitação, que podem afetar a formação, desenvolvimento e maturação dos frutos (Reforço, 1997; Carvalho *et al.*, 1999; Patrício, 2004; Moreira, 2005).

4. Objetivos

Nos programas de melhoramento podem-se fazer cruzamentos controlados, através de polinizações controladas, sendo muito útil em espécies de polinização anemófila como o sobreiro. As polinizações controladas consistem na transmissão do pólen da árvore selecionada como progenitor masculino para os órgãos reprodutores femininos recetivos da árvore-mãe selecionada, excluindo o pólen de outros indivíduos e assegurando descendência de progenitores conhecidos (Valdivieso e Varela, comunicação oral).

Para que esta técnica consiga produzir os resultados desejados, nomeadamente em espécies florestais, é necessário ter em atenção alguns aspetos como a) a identificação em campo dos cruzamentos, com respetiva etiquetagem (que deve ser inequívoca e resistente o suficiente para resistir no campo durante todo o processo de obtenção do fruto), b) a qualidade dos sacos de isolamento dos ramos, cuja principal função é impedir a contaminação de pólen estranho ao cruzamento (devendo ser resistente a possíveis danos), mas muitas vezes apresentam problemas a nível fitossanitário (humidades elevadas dentro dos sacos), c) o tamanho e colocação adequada dos sacos (as superfícies dos estigmas devem estar livres), d) a qualidade do pólen utilizado e o momento mais adequado para a sua aplicação sobre as estruturas femininas recetivas (condições meteorológicas adequadas), e) possíveis contaminações com pólen quando se abrem os sacos, emasculação dos ramos isolados, e possíveis surtos de floração masculina dentro dos sacos, f) o momento mais adequado para isolamento das estruturas femininas, havendo a necessidade, nestes últimos pontos, de um conhecimento da biologia floral e reprodutiva da(s) espécie(s) e comportamento fenológico dos indivíduos selecionados para o melhoramento, entre outros. Para além destes aspetos podem surgir ainda problemas de ordem mais prática, com uma logística mais ou menos complicada, como a acessibilidade dos ramos isolados, que em espécies florestais podem estar muito altos na copa. Por fim, é ainda de salientar que as polinizações controladas ao ar livre estão sempre sujeitas às variáveis meteorológicas, com poder de condicionar o seu sucesso (Valdivieso e Varela, Specificities of control-pollination in forest trees (em publicação)).

No sobreiro, as polinizações controladas foram discutidas por Varela e Valdivieso (1996) que sugeriram uma metodologia de aplicação da técnica, atentando às complexidades do seu comportamento reprodutivo. Um exemplo prático de polinização controlada em castanheiro (mesma família do sobreiro) é apresentado por Valdivieso e Costa (2006) e em sobreiro por Varela *et al.* (2014).

Sendo o sobreiro uma espécie de grande valor em Portugal e para os portugueses e por isso, de grande interesse melhorar, e tendo estas questões das polinizações controladas presentes, o principal objetivo deste trabalho passou pela criação de conhecimento e condições que permitissem a instalação de flores femininas *in vitro* para realização de polinizações controladas em ambiente controlado com a finalidade de estabelecer uma ferramenta para os programas de melhoramento menos dependente das condições de campo. Se esta prática se revelasse possível teria a potencialidade de facilitar as operações de cruzamentos controlados, tornando-os mais expeditos e com a possível superação de alguns dos problemas e questões supramencionadas, e acelerar o processo de melhoramento genético.

Na prossecução deste objetivo, neste trabalho, desenvolveu-se o conhecimento em duas vertentes complementares:

- a) utilização de diferentes abordagens para o estabelecimento *in vitro* de explantes de sobreiro colhidos diretamente do campo;
- b) estudos fenológicos e ontogenéticos em árvores já objeto de acompanhamento prévio.

Na primeira abordagem, procurou estabelecer-se um protocolo que permitisse controlar as contaminações endógenas associadas ao explante e assegurar a manutenção (crescimento ou, pelo menos, não senescência) *in vitro* de diferentes explantes retirados de material diretamente do campo. Tentou-se assim estabelecer um método que permitisse a instalação e manutenção *in vitro* de flores femininas de *Quercus suber* para sua polinização e posterior obtenção de embriões.

Na segunda via, procurou-se obter um conjunto de conhecimentos sobre a biologia floral e reprodutiva do sobreiro que posteriormente permitisse:

- Relacionar a evolução da fenologia vs. ontogenia com a possível evolução dos tecidos reprodutivos *in vitro*;
- Conhecer quais os tecidos que devem ser instalados para a obtenção de flores femininas *in vitro* e em que períodos se devem fazer as colheitas de material de forma a assegurar que a diferenciação floral já se deu e que as flores ainda não foram polinizadas, assim como a disponibilidade e abundância relativa de flores femininas para instalação *in vitro*;
- Conhecer a sequência fenológica da flor feminina e do fruto assim como a ocorrência de possíveis fenómenos anormais nesta evolução fenológica, tais como florações atípicas (outras épocas de colheita) e formação de frutos bienais (prolongamento do tempo da formação do embrião *in vitro*);
- Conhecer o tempo decorrido *in vivo* entre a polinização e a fecundação para poder estabelecer um paralelo com o processo “*in vitro*”;
- Conhecer a evolução do gametófito feminino e da maturação do embrião para se poder estabelecer um paralelo entre a evolução *in vivo* e a possível evolução *in vitro*, uma vez que o objetivo final é a obtenção de embriões provenientes de polinizações controladas feitas em condições *in vitro*.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Caracterização da parcela

Este trabalho desenvolveu-se numa parcela permanente de sobreiro (*Quercus suber* L.) na herdade da Quinta da Serra que se localiza no Parque Natural da Arrábida, perto de Azeitão a sul da Península de Setúbal, centro de Portugal (lat.- 38 ° 29' N; long.- 09 ° 01' O, altitude- 116 m).

A parcela, de aproximadamente 1,5 ha, é constituída por sobreiros de regeneração natural, de espaçamento irregular, idades diferentes, com exploração intensiva para a cortiça.

As condições edafoclimáticas do local são favoráveis ao sobreiro. Os tipos de solos dominantes são os “Aluviossolos modernos e Aluviossolos antigos, de textura mediana” segundo a classificação de solos portuguesa (SROA, 1969) que se definem como solos incipientes, de acumulação de aluviões ou co-aluviões, profundos, de pH neutro, com baixa a média capacidade de troca catiónica, conteúdo em matéria orgânica baixo a médio, bem arejado na camada superficial, com excelente regime hídrico e com evidências de bons níveis de retenção de água.

O clima é tipicamente Mediterrâneo com influência oceânica. A temperatura máxima média é 29,0 °C e a temperatura mínima média 5,6 °C, com 4-5 meses de seca e precipitação média anual de 764 mm (figura 2).

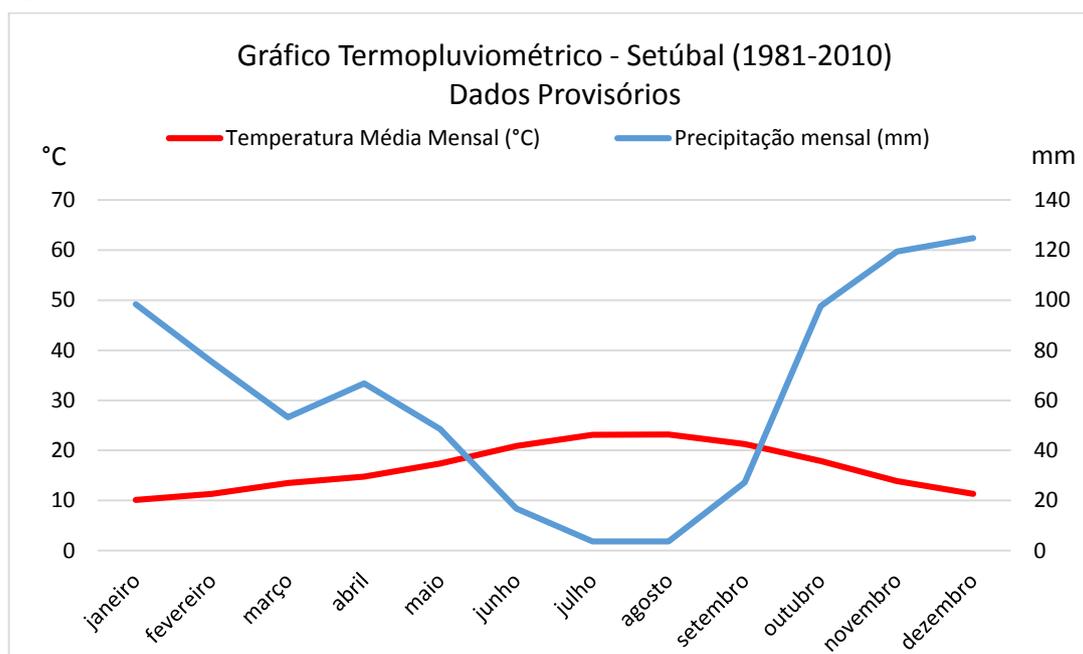


Figura 2: Gráfico termopluviométrico de Setúbal. Dados mensais da temperatura média do ar e da precipitação média da quantidade total de uma série de normais climatológicas no período de 1981-2010 (dados provisórios obtidos no site do Instituto Português do Mar e da Atmosfera: <http://www.ipma.pt/pt/> - acedido entre 29/09/2014 e 02/10/2014).

2. Cultura de tecidos

2.1. Recolha e tratamento do material vegetal de campo

Para o estabelecimento *in vitro*, numa fase inicial, efetuaram-se cortes de ramos lenhosos de árvores adultas da parcela em estudo, com comprimentos entre 40 a 60 cm e, tanto quanto possível, com um diâmetro do eixo principal entre 1 a 2 cm, durante os meses de abril a julho, escolhendo-se

ramos que apresentam novos crescimentos onde se poderão encontrar primórdios de inflorescências femininas. Nos meses de agosto e setembro optou-se por se levar ramos de comprimentos semelhantes mas com diâmetros consideravelmente maiores, compreendidos entre 6 e 20 cm, para posterior abrolhamento em condições de laboratório.

Transportaram-se os ramos em condições de humidade relativa elevada, no escuro e à temperatura ambiente.

Chegando ao laboratório do ISA, procedia-se a uma desfolha parcial dos ramos colhidos entre abril e julho, retirando-se a maior parte das folhas adultas, coriáceas, mantendo o material em condições de humidade relativa elevada numa sala com luminosidade e temperatura ambientes até se recolher o material para instalação *in vitro*. Para o material colhido a partir do mês de junho, borrifava-se depois semanalmente os ramos com uma solução de fungicidas (carbendazime segundo a formulação comercial Derosal da AgrEvo, 0,75 g/l + dinocape segundo a formulação comercial Dikar da Bayer, 30µl/l) e adubo foliar (Zetaminol da Syngenta, 1 g/l), para diminuir a quantidade de inóculo trazida do campo.

Nos meses de agosto e setembro os ramos de maiores diâmetros foram totalmente desfolhados e os ramos secundários podados, deixando-se só o eixo principal e as inserções dos ramos secundários. Borrifaram-se semanalmente os ramos com a mesma solução de fungicidas desde que chegaram do campo. Mergulhou-se uma das superfícies de corte do eixo principal em água com algumas gotas de detergente durante cerca de um mês e meio, tendo-se acrescentado Zetaminol (1g/l) à solução no final desse período. Mantiveram-se os ramos em condições de luminosidade, temperatura e humidade relativa ambiente.

2.2. Instalação *in vitro*

Segmentos apicais e nodais com 1 a 2 gomos axilares (em geral) retirados de tecidos novos do crescimento recente dos ramos trazidos do campo foram o material utilizado como explantes iniciais na cultura de tecidos.

Nos ramos, colhidos entre abril e julho, o material era instalado até duas semanas depois da data de colheita dos ramos, não se verificando novos abrolhamentos nestes ramos durante este período (o abrolhamento e desenvolvimento inicial dos lançamentos utilizados ocorreu no campo), verificando-se, ao invés, uma progressiva perda de vitalidade, com murchidão e senescência de folhas (adultas e jovens) e dos novos crescimentos. Nos meses de agosto e setembro, na ausência de novos rebentos desenvolvidos no campo, trataram-se os ramos de forma diferente (como anteriormente descrito) para obtenção de novos rebentos nas condições ambiente do laboratório. Passados 15-20 dias tinham-se já desenvolvido novos rebentos, no estágio de orelha-de-rato, entre 10 e 25 cm de comprimento, a partir de gomos secundários ou adventícios, designadamente nas inserções dos ramos secundários podados e em fissuras na cortiça ou zonas que não apresentam esta camada *suberificada*, tendo este material originado os explantes iniciais utilizados neste período. Mais tarde foram ainda aproveitados novos rebentos que se desenvolveram nas axilas de alguns lançamentos que se deixaram nos ramos. Com esta metodologia conseguiu-se assim ter material disponível para instalação durante mais tempo (cerca de dois meses). Dos rebentos recentes eram então preparados os explantes iniciais para se proceder à sua instalação *in vitro*. Mantiveram-se secções ou, quando pequenas, as folhas completas nos

explantes instalados em água de agar (0,8% p/v), uma vez que o fornecimento de nutrientes aos explantes foi feito através da aplicação de Zetaminol (1 g/l), um adubo foliar, a cada três ou quatro dias. Nos explantes instalados em meios com nutrientes subtraíram-se as folhas.

Antes da instalação, os explantes passavam por um processo de desinfecção superficial (quadro 2). Foram realizadas várias desinfecções diferentes, tendo-se utilizado só uma ou diferentes combinações das seguintes formulações: hipoclorito de sódio em concentrações entre 1 e 5% da lixívia comercial (a 5%), hipoclorito de cálcio em concentrações que variaram entre 1 e 10%, etanol a 70 e 96%, água oxigenada a 3 %, soluções de fungicidas (carbendazime, 0,75 g/l isolado ou em solução com dinocape, 30µl/l), Tween 20 e detergente da loiça. Por vezes durante o processo de desinfecção, utilizavam-se antioxidantes como a tioureia (numa concentração final de 500 mg/l), ácido ascórbico (50 mg/l) e o ácido cítrico (50 mg/l). Tentava-se também eliminar eventuais escamas que estivessem junto aos gomos, evitando assim mais uma possível fonte de inóculo. Na observação das contaminações *in vitro*, por vezes utilizou-se uma lupa binocular (Olympus SZX9).

Quadro 2: Processos de desinfecção superficial utilizados nos explantes iniciais antes da sua instalação *in vitro* e respetivos códigos de identificação, usados ao longo do trabalho para referir cada um destes processos.

CÓDIGO	DESINFECÇÕES SUPERFICIAIS DOS EXPLANTES INICIAIS ¹
Esc	Remoção das escamas
Lix1	Lixívia (1/50) a 1% – no ramo com pequena escova (sem remoção das escamas dos gomos)
Lix2	Lixívia (1/50) a 1% – no ramo com pequena escova → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) (sem remoção das escamas dos gomos)
Lix3	Lixívia comercial (5%) a 10% + 4 gotas de Tween20 (15-20 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min)
Lix4	Lixívia comercial (5%) a 2% + 4 gotas de Tween20 (15-20 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min)
Lix5	Lixívia comercial (5%) a 2% + 4 gotas de Tween20 (15-20 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → passagens por solução de ácido ascórbico (50 mg/l) e ácido cítrico (50 mg/l)
HCa1	Fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → Ca(ClO) ₂ a 10% + 2 gotas Tween20 (5-10 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → remoção das escamas
HCa2	Remoção das escamas → Ca(ClO) ₂ a 10% (10 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min)
HCa3	Remoção das escamas → Ca(ClO) ₂ a 10% (15-20min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min)
HCa4	Fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → Ca(ClO) ₂ a 5% + 2 gotas Tween20 (5-10 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → remoção das escamas
HCa5	Ca(ClO) ₂ a 1% + 3-4 gotas de Tween20 (10 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada com agitação (2-5 min) → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) (10 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada com agitação (2-5 min)
HCa6	Remoção das escamas → Ca(ClO) ₂ a 1% (15min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l)
EtOH:H ₂ O ₂	Etanol 70% (1min) → H ₂ O ₂ 3% : Etanol 96% (1:1) (10 min) → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min)

EtOH.HCa	Etanol 70% (30 s) → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) + Ca(ClO) ₂ a 10% + 3-4 gotas de Tween20 (10 min) → 3-4 lavagens com dH ₂ O esterilizada (5 min)
FunCarb	Remoção das escamas → fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min)
Fun ² 1	Tratamento dos rebentos no ramo com solução de fungicidas (Carbendazime, 0,75 g/l + Dinocape, 30 µl/l) no dia da instalação → lavagem dos explantes com dH ₂ O + 3 gotas de detergente da loiça (10 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (3-5 min)
Fun ² 2	Tratamento dos rebentos no ramo com solução de fungicidas (Carbendazime, 0,75 g/l + Dinocape, 30 µl/l) 24 h antes → lavagem dos explantes com dH ₂ O + 3 gotas de detergente da loiça (30 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (10 min)
Fun ² Antiox1	Tratamento dos rebentos no ramo com solução de fungicidas (Carbendazime, 0,75 g/l + Dinocape, 30 µl/l) no dia da instalação → Preparação dos explantes imersos em tiourea (500 mg/l) → tiourea (500 mg/l) + 3 gotas detergente da loiça + 3 gotas de Tween20 (20 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada (10 min)
Fun ² Antiox2	Tratamento dos rebentos no ramo com solução de fungicidas (Carbendazime, 0,75 g/l + Dinocape, 30 µl/l) no dia da instalação → Preparação dos explantes em ácido ascórbico (50 mg/l) → ácido ascórbico (50 mg/l) + 3 gotas de detergente da loiça + 3 gotas de Tween20 (20 min)
Fun ² Antiox3	Tratamento dos rebentos no ramo com solução de fungicidas (Carbendazime, 0,75 g/l + Dinocape, 30 µl/l) no dia da instalação → ácido ascórbico (50 mg/l) + 3-4 gotas de Tween20 + 3-4 gotas detergente da loiça (20 min) → 3 lavagens com dH ₂ O esterilizada com agitação (10 min)

1 – Todas as concentrações expressas em percentagem estão em (v/v) com exceção do Ca(ClO)₂, que está em (p/v).

Fizeram-se ainda repicagens de explantes (quadro 3). Durante estas repicagens, procedeu-se a uma desinfecção ligeira, tendo-se recorrido sempre a soluções de fungicidas pois as contaminações que surgiam eram predominantemente causadas por fungos.

Quadro 3: Processos de desinfecção superficial utilizados nas repicagens dos explantes e respetivos códigos de identificação, usados ao longo do trabalho para referir cada um destes processos. Estes processos foram aplicados quando se entendia necessário transferir os explantes para novo meio de cultura, especialmente devido a contaminações.

CÓDIGO	DESINFEÇÕES SUPERFICIAIS NAS REPICAGENS
Rep.FunCarb	Fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) com remoção do excesso de micélio e das partes necrosadas dos explantes → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min)
Rep.FunCarb+HCa	Fungicida (Carbendazime – 0,75 g/l) com remoção do excesso de micélio e das partes necrosadas dos explantes → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min) → Ca(ClO) ₂ a 1% → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min)
Rep.FunDin	Fungicida (Dinocape – 30µl/l) com remoção do excesso de micélio e das partes necrosadas dos explantes → lavagem com dH ₂ O esterilizada (2-5min)
Rep.Fun ²	Solução de fungicidas (Carbendazime, 0,75 g/l + Dinocape, 30 µl/l) com remoção do excesso de micélio e das partes necrosadas dos explantes → lavagem com dH ₂ O esterilizada (5-10 min)
Rep.Fun ² rpm	Solução de fungicidas (Carbendazime, 0,75 g/l + Dinocape, 30 µl/l) com agitação (200 rpm) (15 min) – remoção do excesso de micélio e das partes necrosadas dos explantes

Utilizaram-se três tipos de meios na cultura basais na cultura *in vitro*: MS (Murashige e Skoog, 1962), com sacarose em concentrações até 3% e carbendazime a 0,75 g/l, WPM (Woody Plant Medium, Lloyd e McCown, 1980) com concentrações de sacarose até 2% e suplementado com 0,75 g/l de carbendazime (formulação base destes dois meios encontra-se no anexo I) e água de agar suplementada também com as mesmas concentrações de carbendazime e com 0,5% de sacarose nos casos em que se suspeitou haver intumescimento dos gomos na cultura *in vitro*. Por várias vezes estes meios foram ainda complementados com antibióticos e antioxidantes para diminuir a quantidade de inóculo contaminante e evitar a rápida oxidação dos tecidos, respetivamente. Foram então utilizados

como antibióticos a rifampicina (50 µg/ml) e a cefotaxima (125 µg/ml), nunca os dois no mesmo meio, e como antioxidantes o ácido ascórbico (50 mg/l) e o ácido cítrico (50 mg/l). Chegou-se ainda a utilizar a hormona BAP (1 mg/l) no meio de cultura, numa tentativa de estimular o crescimento dos gomos. A constituição de todos os meios utilizados é apresentada no quadro 4. O pH no meio MS foi acertado a 5,75 e no meio WPM e água de agar a 5,65. Por vezes, na água de agar não se acertou o pH tendo este registado valores na ordem dos 5,3.

Quadro 4: Meios de cultura utilizados nas instalações e repicagens *in vitro* de explantes e os respetivos códigos de identificação, usados ao longo do trabalho para referir cada um destes processos. As concentrações de agar utilizadas nos vários meios variaram entre 8 e 15 g/l.

CÓDIGO	MEIO UTILIZADO
MS1	Meio MS com 30 g/l de sacarose
MS2	Meio MS com 10 g/l de sacarose e KSCN (4,86 g/l)
MS3	Meio MS com 10 g/l sacarose e complementado com carbendazime (0,75 g/l)
MS4	Meio MS com 10 g/l sacarose e complementado com cefotaxima (125 µg/ml)
MS5	Meio MS com 10 g/l sacarose e complementado com cefotaxima (125 µg/ml) e carbendazime (0,75 g/l)
MS6	Meio MS sem açúcar
MS7	MS com 10 g/l de sacarose, carbendazime (0,75 g/l) e complementado com ácido ascórbico (50 mg/l) e ácido cítrico (50 mg/l)
MS8	MS com 20 g/l de sacarose, carbendazime (0,75 g/l) e complementado com BAP (1 mg/l)
WPM1	WPM com 20 g/l de sacarose, carbendazime (0,75 g/l) e complementado com BAP (1 mg/l)
WPM2	WPM com 10 g/l de sacarose e carbendazime (0,75 g/l)
WPM3	WPM com 10 g/l de sacarose, carbendazime (0,75 g/l) e complementado com BAP (1 mg/ml) e rifampicina (50 µg/ml)
WPM4	WPM com 10 g/l de sacarose e complementada com carbendazime (0,75 g/l) e BAP (1 mg/ml)
AA1	Água de agar complementado com carbendazime (0,75 g/l) e rifampicina (50 µg/ml). Procederam-se a aplicações de Zetaminol (1 g/l) sobre os explantes em intervalos médios de 3-4 dias
AA2	Água de agar com carbendazime (0,75 g/l). Procederam-se a aplicações de Zetaminol (1 g/l) sobre os explantes em intervalos médios de 3-4 dias
AA3	Água de agar com 5 g/l sacarose, carbendazime (0,75 g/l) e complementado com cefotaxima (125 µg/ml). Procedeu-se à aplicação de Zetaminol (1 g/l) aquando instalação
AA4	Água de agar com 5 g/l sacarose e carbendazime (0,75 g/l). Procedeu-se a aplicações de Zetaminol (1 g/l) sobre os explantes em intervalos médios de 3-4 dias

3. Fenologia

Foram estudadas inicialmente 25 árvores e durante o período acompanhado aumentou-se para 31 árvores (figura 3), sendo o comportamento reprodutivo das árvores estudado, neste local, desde 1993, através de registos fenológicos e quantificação da floração.



Figura 3: Delimitação da parcela de *Quercus suber* na Quinta da Serra com a identificação das árvores acompanhadas. A árvore estudada em particular (árvore 3) encontra-se destacada no meio da parcela. Imagem do Google Earth (imagem aérea de 23/06/2007).

Durante a realização desta tese (entre março de 2013 e março de 2014) realizou-se o acompanhamento, tanto quanto possível, semanal da fenologia de 31 árvores na parcela descrita anteriormente. Registaram-se informações relativas aos estádios fenológicos vegetativos ao longo do tempo e acompanhou-se a evolução das inflorescências masculinas e femininas e da frutificação (anexo II).

Para o registo fenológico do crescimento vegetativo, da floração e da frutificação foram utilizadas as escalas definidas por Varela e Valdivieso (1996, 2011) e Sá (1995) descritas na revisão bibliográfica, na introdução deste trabalho.

Em cada data e por indivíduo foi feita uma apreciação da representatividade dos diferentes estádios no novo crescimento vegetativo da copa da árvore tendo sido atribuído uma ponderação a cada estádio.

Dos estádios fenológicos da floração definidos nessas escalas apenas se conseguem fazer observações em campo, ao nível do solo, a partir do Bm/Cm para as inflorescências masculinas e a partir do Df para as inflorescências femininas, devido à dimensão das copas e altura das árvores. Para as florações masculinas e femininas apenas se registaram a presença ao longo do tempo dos diferentes estádios fenológicos encontrados, em cada indivíduo.

Em particular, analisou-se a evolução fenológica da árvore 3, escolhida para o acompanhamento histológico da ontogenia de estruturas reprodutivas e gomos axilares, comparando-a com a evolução fenológica do conjunto das árvores estudadas na parcela.

Foram realizados registos fotográficos ao longo do ano dos aspetos mais relevantes das diferentes fases fenológicas com uma máquina digital Canon SX 30 IS acoplada de uma lente 35x.

4. Histologia

4.1. Material vegetal

Entre abril e novembro de 2013 foram realizadas fixações de diferentes estádios fenológicos, em várias datas (20), de inflorescências femininas, frutos de maturação anual e gomos axilares do crescimento mais recente, na árvore 3, escolhida para o acompanhamento histológico. Este material foi colhido e fixado ainda no campo para evitar degradação dos tecidos vegetais. Todas as peças fixadas foram depois conservadas em etanol a 70 % (no frio), não se tendo processado todo o material colhido (quadro 5), uma vez que a homogeneidade das amostras não o justificou.

Quadro 5: Processamento do material vegetal colhido para acompanhamento histológico da árvore 3. Número total de amostras de cada tipo de estrutura vegetal (colhidas em diferentes datas e/ou estádios fenológicos) que passaram pela colheita, fixação e conservação em etanol a 70% (4 °C), inclusão em parafina e o número de amostras que foram cortadas e coradas.

	Número de amostras		
	Conservadas	Incluídas	Corados
Gomos Axilares	95	50	20
Inflorescências femininas	50	17	12
Frutos anuais	20	10	7

4.2. Protocolos

O estudo histológico das estruturas reprodutivas do sobreiro foi realizado em peças de diferentes dimensões e densidades. A densidade pode mesmo variar na mesma peça, como é o caso do fruto que é constituído por um pericarpo seco, mais denso que o interior onde se encontra o embrião, alvo principal deste estudo. Assim, houve a necessidade de se adaptar protocolos consoante as dimensões e características físicas das peças.

Os protocolos histológicos, usando a parafina como meio de inclusão, dividem-se em três: fixação, desidratação e inclusão:

- **Fixação:** A célula é um complexo de estruturas altamente organizadas. Qualquer perturbação nesta organização causa alterações que podem afetar a sua morfologia (Valdivieso, 1991). O objetivo da fixação é preservar a célula evitando a sua desorganização. Através de técnicas de fixação, os tecidos são mortos por imersão numa solução que inibe os seus processos vitais, prevenindo alterações nas suas propriedades físicas (Valdivieso, 1991).

- Desidratação: A desidratação é um processo preparatório dos tecidos, para a inclusão. Consiste na remoção gradual da água das células e na sua substituição por uma substância solúvel no material de inclusão (Valdivieso, 1991). Tal como na fixação, as peças de diferentes dimensões e características físicas passaram por períodos de desidratação diferentes.
- Inclusão: A inclusão é o processo pelo qual os conteúdos celulares dos tecidos vão ser preenchidos por um meio sólido proporcionando um suporte para a realização dos cortes histológicos.

Foram utilizados vários protocolos dos quais aqui se destacam três:

A. Protocolo 1

i. Fixação

O fixador utilizado foi o F.A.A. (Formaldeído, ácido acético glacial, álcool 70%) na proporção 1:1:18. A duração da fixação variou conforme as características físicas de cada peça, tendo as peças mais pequenas e menos densas como as flores femininas até ao estágio Gf e gomos axilares sido fixadas durante 48 horas e as peças maiores e mais densas como as flores femininas em Hf e os frutos sido fixadas durante 72-96 horas, sempre no frio (aproximadamente 4 °C).

Ainda, para facilitar e assegurar uma eficiente penetração do fixador nas células do interior dos frutos, estes foram seccionados antes da fixação. Dissecaram-se longitudinalmente, com dois cortes paralelos de cada lado, pequenos segmentos do fruto. Também, nos frutos nas fases finais do seu desenvolvimento, se procedeu à remoção de cerca de dois terços das suas bases, junto ao pedúnculo, tendo-se conservado o terço superior onde se encontram as estruturas de interesse como o embrião. Após o período de fixação, as peças eram conservadas no frio (aproximadamente 4°C) em etanol a 70%.

ii. Desidratação

Todas as inflorescências femininas até ao Gf assim como os gomos axilares, passaram por períodos de desidratação mais curtos que as restantes peças. Utilizou-se a seguinte série de desidratação constituída por uma mistura de TBA (tertiary butyl alcohol), etanol absoluto e água destilada para os gomos axilares e as inflorescências femininas até ao estágio Gf:

- 1:4:5 (8 horas), 2:5:3 (16 horas), 3,5:5:1,5 (8 horas), 5,5:4,5:0 (16 horas), 7,5:2,5:0 (8 horas), TBA puro - 3 períodos (16 horas, 8 horas, 48 horas).

Para as flores femininas em Hf e os frutos utilizou-se a seguinte série:

- 1:4:5 (24 horas), 2:5:3 (24 horas), 3,5:5:1,5 (24 horas), 5,5:4,5:0 (24 horas), 7,5:2,5:0 (8 horas), TBA puro - 3 períodos (24 horas, 24 horas, 48 horas).

No final de cada série ainda se fez um período de 40 horas com uma mistura de óleo de parafina e TBA (1:1) para amaciar os tecidos facilitando assim o corte das peças incluídas.

iii. Inclusão

A infiltração da parafina nas peças desidratadas foi feita de forma gradual. Deixou-se solidificar parafina até $\frac{3}{4}$ do volume do frasco, suficiente para cobrir, pelo menos, três vezes o material e colocou-

se o material no topo da parafina solidificada, tendo-se depois completado o restante volume do frasco com nova mistura em partes iguais de óleo de parafina e TBA, solvente da parafina.

Colocaram-se depois os frascos numa estufa com temperatura a 60 °C, uma vez que o ponto de fusão da parafina utilizada é de 56 a 60 °C, para que o TBA fosse evaporando, facilitando assim a infiltração gradual da parafina no material. Por fim, a parafina foi substituída por duas vezes em intervalos de 48+48+72 horas nas peças pequenas e pouco densas e em intervalos de 48+48+80 horas nas peças de maiores dimensões e de material mais denso, para assegurar a infiltração da parafina em todos os tecidos das peças em inclusão. No final deste período procedeu-se à montagem em blocos do material incluído.

B. Protocolo 2

i. Fixação

Procedeu-se da mesma forma descrita no ponto 1. i. do protocolo anterior.

ii. Desidratação

Utilizou-se a seguinte série de desidratação constituída por crescentes concentrações de etanol desde os 70% ao absoluto, terminando no xilol, para material de pequenas dimensões e pouco denso:

- Dois períodos de uma hora e meia em etanol a 70% - dois períodos de uma hora e meia em etanol a 90% - período de uma hora e meia em etanol a 95% - dois períodos de uma hora e meia em etanol absoluto - período de 4 horas em xilol puro.

iii. Inclusão

A infiltração da parafina (p. f. entre 56-60 °C) no material, neste protocolo, foi feita de forma mais célere. Frascos com parafina líquida são conservados num banho-maria a cerca de 60 °C. Imergiu-se apenas o material proveniente da desidratação na parafina líquida, durante 4 horas. Após este período, para assegurar a infiltração da parafina no material, colocam-se os frascos numa estufa a cerca de 60 °C durante 24 horas.

C. Protocolo 3

i. Fixação

O fixador utilizado era constituído pelos mesmos reagentes mas em concentrações diferentes (1:1:8). A fixação teve a duração de 25 horas dividida em três períodos com durações de 16, 6 e 3 horas, com substituição do fixador ao final do primeiro e segundo períodos, mantendo-se as peças mergulhadas no fixador sempre em agitação e à temperatura ambiente. Procedeu-se da mesma forma para todo material fixado.

O material foi preparado para fixação da mesma forma que nos protocolos anteriores.

ii. Desidratação

Utilizou-se a seguinte série de desidratação desde os 50% ao absoluto, terminando no xilol, para material de menores dimensões e densidades:

- Dois períodos de meia hora em etanol a 50% - período de meia hora em etanol a 60% - período de meia hora em etanol a 70% - período de meia hora em etanol a 80% - período de meia hora em etanol a 90% - dois períodos de uma hora em etanol absoluto - período de meia

hora numa solução de etanol absoluto:xilol (3:1) - período de meia hora numa solução de etanol absoluto:xilol (1:1) - período de meia hora numa solução de etanol absoluto:xilol (1:3) - três períodos de uma hora em xilol.

Para o restante material utilizou-se o mesmo esquema acima mas em vez de meia hora decidiu-se fazer períodos de uma hora nas três soluções de etanol absoluto e xilol.

Neste protocolo as peças eram conservadas em etanol absoluto no frio (aproximadamente 4 °C). Assim, desde que se começava a fixação só se parava, eventualmente, o processo no passo do etanol absoluto.

iii. Inclusão

A inclusão foi feita de forma bastante progressiva. Durante 16h (overnight) manteve-se o material numa solução de xilol saturada com parafina, à temperatura ambiente. Passou-se depois para uma estufa a 30 °C durante 4 horas. Aumentou-se depois a temperatura para os 42 °C, durante 4 horas. Por fim aumentou-se a temperatura da estufa para 60 °C até as pastilhas de parafina terem derretido por completo. Deixou-se ficar na estufa durante a noite a 60 °C. Finalmente, fizeram-se três períodos de 3 horas tendo-se feito trocas de parafina liquefeita no início de cada período.

Este processo de inclusão foi utilizado para as peças pequenas. Para as peças maiores e de densidades diferentes decidiu-se aumentar a duração dos períodos em parafina líquida tendo-se feito três períodos de 8, 16 e 8 horas.

Em todos os protocolos, a seguir a estas três grandes etapas acima descritas, procedeu-se da mesma forma.

O material foi montado, com a orientação pretendida, em blocos com a mesma parafina utilizada na inclusão, em formas de silicone, que serviram de molde aos blocos. Efetuaram-se depois cortes de espessuras entre os 8 e os 12 µm num micrótomato rotativo da Leica RM 2255, com facas descartáveis Leica Premium Surgipath® DB80 series. Para a montagem dos cortes nas lâminas utilizou-se o adesivo de Haupt's (Valdivieso, 1991). Os cortes foram seguidamente desparafinados em xilol durante cerca de 40 minutos, procedendo-se de seguida à coloração.

Para corar os cortes utilizaram-se duas colorações: a coloração dupla de azul de astra com safranina O (Gričar, 2007) e a hematoxilina segundo a fórmula de Heidenhain. O azul de astra com safranina O foi utilizado essencialmente para diferenciação entre tecidos numa mesma estrutura. A hematoxilina foi utilizada para observação das estruturas histológicas havendo melhor contraste na organização anatómica dos tecidos.

Na coloração azul de astra com safranina O, utilizou-se a seguinte sequência:

- 2 Passagem por etanol a 96% durante 10 minutos, sendo a primeira para eliminar resíduos de xilol;
- Tratamento durante 5 minutos com solução aquosa de azul de astra a 0.04% (m/v), safranina O a 0.15% (m/v) e ácido acético a 2% (v/v) (adaptado de Gričar, 2007);
- Diferenciação em etanol a 96% durante alguns minutos conforme a intensidade de coloração dos cortes, sob o controlo da lupa.

A sequência utilizada para a hematoxilina (adaptado de Valdivieso, 1999) foi a seguinte:

- Rehidratação dos cortes até à água destilada com passagens por uma série decrescente de álcoois;
- Tratamento durante 30 minutos à temperatura ambiente numa solução mordente de cloreto de ferro a 3%;
- Lavagem com água destilada corrente;
- Tratamento durante 15 minutos numa solução aquosa de hematoxilina a 1,25% e uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio até viragem da solução, de castanho a vermelho escuro;
- Diferenciação sob controlo da lupa, numa solução de cloreto de ferro 2% durante alguns segundos a 2 min, conforme as dimensões e tipo de estrutura a corar.

Após as colorações fizeram-se montagens permanentes, para observação ao microscópio ótico, usando o Bálsamo do Canadá como meio de montagem entre a lâmina e a lamela, tendo sido antes necessário desidratar novamente os cortes e passá-los por xilol, no caso da coloração com hematoxilina, e passá-los por xilol após lavagem com etanol a 96%, no caso da dupla coloração.

Finalmente procedeu-se à observação dos cortes obtidos em microscópio ótico de transmissão (Olympus BX41) e em lupa (Leica DMS 1000). A aquisição de imagem foi realizada com o equipamento ProgRes® CapturePro 2.8 - JENOPTIK Optical Systems utilizando o software Systeme ProgRes® program - JENOPTIK Optical Systems no microscópio e na lupa com o programa Leica Application Suite (LAS) version 4.4.0.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Cultura de tecidos

1.1. Instalação *in vitro* de segmentos apicais e nodais

Neste trabalho procurou instalar-se, de forma expedita, tecidos vegetais que possam conter meristemas ou estruturas reprodutivas (obrigatoriamente de árvores adultas e com material colhido diretamente do campo), tentando-se promover um controlo das contaminações do material instalado e, pelo menos, a manutenção da vitalidade dos explantes *in vitro*.

Tanto quanto se conhece da bibliografia disponível, a instalação de explantes de material vegetal colhido diretamente do crescimento de rebentos nas copas de árvores adultas no campo, em sobreiro e noutras espécies de carvalhos, nunca foi conseguida. O único registo que se conhece sobre iniciação de culturas *in vitro* de espécies do género *Quercus* a partir do crescimento do ano foi em jovens plantas (4 anos de idade) de *Q. rubra* que cresciam em vasos numa estufa, tendo o seu sucesso, ainda assim, sido muito limitado (18,8%), especialmente quando comparado com a reatividade das culturas com origem em novos rebentos que abrolharam (6 semanas depois) de segmentos de ramos colhidos das mesmas plantas (62,5%) (Vieitez *et al.*, 1993). Os resultados apontam assim então para a necessidade de se proceder a pré-acondicionamentos e preparações prévias do material colhido das copas das árvores adultas para se iniciar culturas de rebentos *in vitro* asséticas e viáveis. No sobreiro considera-se mesmo que a capacidade de evolução dos gomos é bastante reduzida quando os segmentos de ramos destacados não passavam por um tratamento de pré-acondicionamento antes de desenvolverem novos rebentos, origem dos explantes iniciais (Romano *et al.*, 1992a).

1.1.1. Desinfecções

Neste trabalho, antes de serem instalados *in vitro*, os explantes passaram por uma das desinfecções superficiais apresentadas no capítulo referente aos materiais e métodos. Neste capítulo são agora enumeradas e discutidas algumas das observações mais relevantes relativas aos processos de desinfecções superficiais realizados. Estes encontram-se agrupados por agente principal no processo, com o objetivo de se testar sobretudo a eficiência desse agente no controlo das contaminações mas também o seu possível efeito no acastanhamento e/ou oxidação dos tecidos. Assim, num processo de desinfecção, para além das contaminações, existe também uma preocupação com o acastanhamento dos tecidos e/ou do meio de cultura, proporcionado, muitas vezes, pelo uso de alguns agentes de desinfecção (Romano e Martins-Loução, 1992). Segundo Romano (1994), dois dias são suficientes para se registar a exsudação de compostos fenólicos em explantes de material de árvores adultas de sobreiro e duas semanas para a maioria dos contaminantes se manifestarem.

Para começar, decidiu-se, antes de mais, instalar *in vitro* alguns gomos axilares, no período da quebra de dormência invernal, recorrendo-se apenas à remoção das escamas invernais (**Esc**). Este procedimento levou ao rápido desenvolvimento de contaminações, tendo-se identificado fungos, com formação de esporulações, e colónias de bactérias. Os explantes foram eliminados uma semana após a sua instalação. As contaminações representam um dos maiores problemas na micropropagação de material adulto desta espécie, especialmente quando se usa material diretamente do campo sem

nenhuma fase de acondicionamento e tratamento prévios (Romano e Martins-Loução, 1992; Romano *et al.*, 1992a).

O primeiro agente de desinfecção ensaiado foi o hipoclorito de sódio diluído a partir de **lixívia** comercial. Nalguns dos processos delineados, recorreu-se também ao uso de um fungicida e antioxidantes. No **Lix1** registou-se um ligeiro atraso no estabelecimento e desenvolvimento das contaminações mas estas continuaram a surgir, sendo os explantes eliminados após, aproximadamente, uma semana. No **Lix2** continuou-se a registar muitas contaminações, particularmente por fungos. É de destacar que os métodos anteriores foram sobretudo aplicados a gomos de inverno, próximos do abrolhamento. Só a partir do **Lix3** se registaram algumas melhorias, embora ainda se tivesse assinalado uma grande percentagem de explantes contaminados, cerca de 2/3, ao final de três dias. Aproximadamente duas semanas após a instalação, em apenas 1/5 dos explantes não se observavam contaminações, embora se registasse alguma oxidação dos tecidos. Nesta fase, as contaminações eram geradas essencialmente por fungos. No **Lix4**, os resultados foram muito semelhantes ao **Lix3**, com $\frac{3}{4}$ dos explantes contaminados por fungos ao final de 10 dias e uma maior taxa de explantes oxidados. Para além dos gomos axilares, experimentou-se ainda instalar *in vitro* flores masculinas em estádios iniciais do seu desenvolvimento, utilizando o processo de desinfecção **Lix5**. As contaminações observadas nos amentilhos foram muito mais severas que nos gomos axilares, com resultados muito equivalentes aos do **Lix4**. Registou-se ainda, ao final de 10 dias, oxidação em $\frac{3}{4}$ dos explantes que, embora tivessem sido tratados com antioxidantes, tiveram origem em material vegetal menos vital e ativo.

O hipoclorito de sódio embora considerado, por alguns, pouco eficiente (Manzanera e Pardos, 1990) foi também já eleito por outros (Romano, 1994, Carvalho, 1992) como um dos agentes de desinfecção superficial mais eficiente no controlo de contaminações e viabilidade de explantes de sobreiro. Aumentar a concentração de hipoclorito de sódio (de 5 para 10%), em vez do tempo de exposição, foi benéfico no controlo das contaminações de explantes proveniente de material adulto de sobreiro (Romano, 1994). Contudo, no presente trabalho, com utilização de material adulto diretamente do campo, não se obtiveram substanciais diferenças entre distintas concentrações deste agente (processos **Lix3** e **Lix4**, 10% e 2%, respetivamente) aplicados a explantes com características semelhantes, tendo-se mesmo optado por diminuir esta concentração para mitigar possíveis efeitos na oxidação dos tecidos e libertação de exsudados.

Seguiram-se desinfecções tendo por base o **hipoclorito de cálcio**. Nalguns destes processos de desinfecção utilizaram-se também um fungicida e um detergente. No **HCa1**, quatro dias após a instalação registou-se que 2/3 dos explantes se encontravam contaminados por fungos. No entanto, numa observação mais detalhada numa lupa binocular, foi possível observar-se em todos os explantes emissões de hifas. Também neste dia 1/3 dos explantes encontravam-se oxidados. No fim de uma semana após a desinfecção, todos os explantes apresentavam contaminações por fungos, macroscopicamente visíveis e oxidação. No **HCa2**, as contaminações foram melhor controladas, tendo-se observado micélio em apenas 1/7 dos explantes quatro dias após instalação. Só foi necessário repicar estes explantes apenas um mês após a instalação. No **HCa3**, embora os explantes tenham libertado alguns fenóis para o meio 24 horas após instalação, só se observou micélio em cerca de 1/4

dos explantes 6 dias após desinfecção. Estes explantes apenas foram repicados devido às contaminações três a quatro semanas após desinfecção. No **HCa4**, quatro dias após instalação, cerca de 5/7 dos explantes estavam contaminados ou a começar a desenvolver contaminações enquanto 1/4 dos explantes se encontravam oxidados. Estes casos de oxidação eram particularmente visíveis em explantes de menores dimensões com entrenós mais curtos. Uma semana após desinfecção todos os explantes estavam contaminados por fungos e oxidados. No **HCa5**, embora tivesse havido libertação de muitos fenóis para o meio e oxidação de tecidos em todos os explantes ao longo dos primeiros 15 dias (material colhido no verão), foi só no final deste período que começou a surgir micélio. No **HCa6**, os primeiros sinais de micélio foram observados uma semana após desinfecção tendo as contaminações progredido lentamente, tendo só sido necessário repicar cerca de 15 dias após desinfecção.

Quanto às concentrações de hipoclorito de cálcio utilizadas, os resultados não foram muito conclusivos, tendo os melhores resultados no controlo das contaminações sido registados nas concentrações 10 e 1%. Este tópico precisaria de mais repetições. Relativamente ao acastanhamento do meio e/ou dos tecidos, nestes processos de desinfecção, nem sempre se observou uma relação entre a oxidação e exsudação e o aparecimento de contaminações observados por outros autores (Gonçalves e Rainho, 1992; Romano, 1994). Neste trabalho obtiveram-se melhores resultados quando se utilizaram durações da exposição ao hipoclorito de cálcio de cerca de 10 minutos. A duração entre 5-10 minutos revelou-se insuficiente no controlo das contaminações enquanto tempos de exposição superiores a 15 minutos revelaram-se menos eficientes. Aumentando as durações de exposição deste agente (de 15 para 30 minutos), Romano (1994) obteve resultados análogos. É de ressaltar, contudo, que neste trabalho, a maioria do material desinfetado com o hipoclorito de cálcio foi colhido na primavera, após abrolhamento dos gomos inverniais, na altura de maior atividade nas árvores, o que poderá ter tido alguma influência no controlo das contaminações e na vitalidade dos explantes, apesar de se ter observado alguma exsudação inicial de compostos fenólicos. Segundo Chalupa (1987), a melhor altura para colheita de material em crescimento ativo é na primavera e início do verão, quando os rebentos não estão ainda severamente contaminados por bactérias e fungos. Poderá também ter sido por este motivo que, quando comparados os processos **Lix3** e **HCa3** que, para o respetivo agente desinfetante, utilizaram-se as mesmas concentrações e durações de desinfecção, se registou uma resposta melhor por parte dos explantes desinfetados com hipoclorito de cálcio. Não obstante, Romano (1994) obteve resultados que seguem esta mesma tendência.

Experimentaram-se também desinfecções com base em **etanol** complementadas com água oxigenada, um fungicida e hipoclorito de cálcio. O **EtOH:H₂O₂**, levou a uma percentagem elevada de explantes oxidados e foi pouco eficiente no controlo das contaminações, tendo-se observado fungos em todos os explantes num período de 4 dias. No **EtOH.HCa**, a oxidação dos tecidos vegetais, embora ainda muito relevante, deu-se de forma mais gradual e as contaminações foram pouco controladas, tendo surgido fungos e colónias de bactérias em quase metade dos explantes ao final de 2 dias. Estes explantes, no entanto, começaram a perder a vitalidade já no processo de desinfecção, embora tenham sido colhidos com aspeto fisiologicamente ativo.

No primeiro caso, o insucesso do processo de desinfecção poderá ter que ver com o estágio fenológico mais atrasado em que grande parte dos explantes se encontravam na altura da instalação.

Os explantes encontravam-se num estágio anterior ou muito inicial de orelha-de-rato, antes do alongamento do eixo, sendo os entrenós mais curtos. Para além de possivelmente haver mais dificuldade das soluções desinfetantes entrarem em contacto com toda a superfície a desinfetar, os explantes encontravam-se em estádios muito incipientes e provavelmente mais sensíveis, sendo o etanol um agente de desinfeção agressivo para os tecidos vegetais, podendo levar a oxidações quando se aumenta o tempo de exposição (Romano, 1994). O conjunto destes fatores poderá explicar os resultados obtidos neste processo. Embora o processo em que se conjugou o efeito do etanol com o do hipoclorito de cálcio tenha sido um pouco mais eficiente que o processo anterior, tudo leva a crer que este foi prejudicial para a vitalidade dos explantes. No entanto, o material vegetal utilizado foi colhido no final de julho, numa altura de stress hídrico, tendo os explantes com caules de menores diâmetros sido mais afetados no período de desinfeção. Também a partir desta altura e durante o período estival, aumentou a incidência de novos rebentos de cor avermelhada nos ramos colhidos no campo, o que pode ser um sinal de stress, podendo-se repercutir depois na exsudação de fenóis e vitalidade dos explantes *in vitro*. Outros autores consideraram este processo o mais eficiente (Gonçalves e Rainho, 1992 e Romano, 1994).

Fizeram-se ainda desinfeções em que o agente desinfetante principal foi **fungicidas**. Nalguns destes processos também se utilizaram antioxidantes. Foram seguidas duas abordagens na aplicação dos fungicidas: a primeira em que o fungicida era aplicado ao explante já pronto a entrar na cultura de tecidos (**Fun**) e a segunda em que a aplicação de fungicidas era feita aos segmentos de ramos, através de pulverizações, pouco tempo antes dos rebentos serem destacados para preparação dos explantes (**Fun²**). Esta última abordagem foi apenas aplicada aos segmentos de ramos colhidos em agosto e setembro, em que os rebentos abrolharam em condições de laboratório.

No **FunCarb**, até ao final da primeira semana as contaminações foram controladas. A partir do final deste período, apareceu micélio especialmente associado aos explantes com tecidos necrosados que, aquando da instalação, já se apresentavam menos vitais relativamente aos restantes. Mais uma vez, na sua grande maioria, os explantes mais necrosados coincidiam com os explantes fenologicamente mais atrasados, em estádios anteriores à fase inicial de alongamento do eixo em orelha-de-rato. Houve também alguma libertação de fenóis. Ao final de duas semanas, eliminaram-se alguns explantes devido à oxidação dos tecidos. As contaminações evoluíram de forma lenta. À semelhança do que aconteceu com os processos com o hipoclorito de cálcio, os explantes que foram desinfetados com o **FunCarb** provinham de ramos colhidos na altura de maior atividade, na primavera, e possivelmente também por esse motivo, as contaminações, maioritariamente por fungos, foram razoavelmente controladas e registaram-se menos fenómenos de oxidação de tecidos.

No **Fun²1**, embora se tivesse registado um eficiente controlo das contaminações durante a primeira semana, os tecidos oxidaram muito rapidamente. Durante a preparação dos explantes do processo de desinfeção **Fun²2**, observou-se uma oxidação muito rápida na superfície de corte dos explantes. Relativamente às contaminações, à semelhança do processo anterior, neste as contaminações também foram eficazmente controladas no decorrer da primeira semana após instalação. Após 7 dias registaram-se as primeiras contaminações aparentemente causadas por leveduras, embora só se tivesse repicado cerca de duas semanas após terem surgido, uma vez que apresentavam evolução

lenta. Nos processos **Fun²Antiox**, através da utilização de antioxidantes, conseguiu-se diminuir de forma razoável a oxidação das feridas de corte dos explantes durante a sua preparação e desinfecção. No **Fun²Antiox1**, cerca de uma semana após instalação quase metade dos explantes apresentaram tecidos necrosados e começaram-se a desenvolver as mesmas contaminações registadas no **Fun²2** numa pequena percentagem dos explantes que também apresentavam alguma redução de vitalidade. No **Fun²Antiox2**, observou-se uma redução da oxidação ao final de uma semana. Quanto às contaminações, registou-se aparecimento de micélio numa pequena percentagem de explantes após uma semana. Finalmente, no **Fun²Antiox3**, houve uma redução dos explantes oxidados relativamente ao processo anterior. Quanto às contaminações, observou-se micélio numa reduzida percentagem de explantes 5 dias após instalação. Aos 7 dias, as contaminações, essencialmente por fungos mas também por bactérias, haviam aumentado em número e intensidade e estavam principalmente associadas a explantes que apresentavam tecidos necrosados. Os explantes que passaram por estes processos de desinfecção terão beneficiado do facto de serem provenientes de rebentos abrolhados em condições com menos contaminações e das aplicações semanais, com uma solução de fungicidas, aos ramos.

Nestes últimos processos as contaminações foram razoavelmente controladas, especialmente no decorrer da primeira semana, embora se tivesse registado elevada incidência de oxidação de tecidos que foi sendo um pouco mitigada pelo uso de antioxidantes.

Em todos os processos de desinfecção realizados, o estágio fenológico juntamente com a vitalidade e vigor do material de origem foram fatores relevantes para o controlo das contaminações e na oxidação dos tecidos. O material com melhores comportamentos nestes aspetos encontrava-se entre os estádios de orelha-de-rato, quando já se distinguiam claramente os entrenós, tendo já começado o período de alongamento do eixo do rebento, e a fase inicial da expansão foliar, quando o eixo do rebento está muito próximo do seu comprimento máximo. Os explantes com origem em rebentos anteriores à fase de orelha-de-rato descrita, em que não era possível distinguir-se claramente os entrenós e em estádios posteriores à fase inicial de expansão foliar, apresentavam normalmente contaminações mais cedo e/ou oxidavam mais rapidamente. Quanto à vitalidade e vigor, quando o material de origem apresentava sinais de murchidão, com tecidos mais moles e/ou a começar a senescer, ou com uma coloração indiciando menor atividade fisiológica, os explantes resultantes destes rebentos não recuperavam e oxidavam mais rapidamente que os restantes, registando-se também, por vezes, uma manifestação mais precoce de contaminações.

Dos métodos de desinfecção testados, os que durante o período de estudo mostraram ser mais eficazes no controlo das contaminações foram os **HCa2**, **HCa3**, **HCa5**, **FunCarb** e os **Fun²**. Os explantes dos processos de desinfecção superficial **HCa2**, **HCa3** e **FunCarb** resultaram de material colhido no período primaveril entre finais de abril e finais de maio, período de maior atividade nas árvores no campo, enquanto os explantes que passaram pelos processos **Fun²** tiveram origem nos rebentos abrolhados em condições de laboratório, em ramos tratados semanalmente com uma solução de fungicidas. A única exceção foi o **HCa5** que, embora tivesse controlado razoavelmente as contaminações nas duas primeiras semanas, os tecidos necrosaram bastante. Este último aspeto estará eventualmente relacionado com a época do ano em que o material vegetal de origem foi colhido

(início do verão), apresentando mesmo os próprios rebentos cor avermelhada, o que indica, à partida, uma grande concentração de fenóis nos explantes. Nos **Fun²** a oxidação dos tecidos foi também uma preocupação embora com perspectivas de ser atenuada com o recurso a antioxidantes.

1.1.2. Repicagens

Quando surgiam contaminações nos explantes mantidos *in vitro* era necessário repicá-los procedendo-se a desinfecções intermédias para eliminar ou reduzir a quantidade de inóculo. Neste trabalho foram utilizados cinco processos diferentes de desinfecções nas repicagens, descritos no capítulo referente aos materiais e métodos e aqui analisados. Nestes processos procurou-se utilizar sempre fungicidas, uma vez que na sua grande maioria as contaminações que surgiam eram fungos. No processo **Rep.FunCarb**, registavam-se novas contaminações por fungos a partir de 3 dias após repicagens sendo os explantes novamente repicados. Nos melhores casos, apenas havia necessidade de se repicar os explantes no período entre uma e duas semanas, enquanto nos piores casos os explantes eram eliminados no mesmo período devido a contaminações e/ou oxidações. No processo **Rep.FunCarb+HCa**, as contaminações começaram a surgir logo no dia após repicagem e 3 dias depois voltaram-se a repicar os explantes e alguns foram mesmo eliminados (provinham e foram repicados para meio com açúcar). No **Rep.FunDin**, o sucesso foi variável. Nos melhores casos, os explantes estavam livres de contaminações ao final de 3 dias e apenas tiveram que ser repicados cerca de uma semana após a repicagem. Nos casos mais extremos, os explantes foram eliminados 4 dias após terem sido repicados. Os **Rep.Fun²** e **Rep.Fun²rpm**, que consistiam na conjugação de dois fungicidas, foram os processos mais utilizados. Houve também, por isso, uma grande heterogeneidade de resultados. Estes processos destinavam-se sobretudo a controlar as contaminações por fungos, não se conseguindo controlar as poucas contaminações por colónias de bactérias que foram surgindo. Relativamente ao controlo dos fungos, nos casos mais severos registou-se ressurgimento de micélio logo nos primeiros dias após repicagens. Já nos melhores casos só se justificou voltar a repicar mais de 20 dias após a última repicagem. Houve também muitos casos intermédios em que o intervalo entre repicagens durou, por exemplo, entre 7 a 15 dias.

Alguma da heterogeneidade de resultados dentro dos mesmos processos de repicagens pode ser em parte justificada pelas diferentes características e historial dos explantes desinfetados. Os resultados, utilizando o mesmo processo de desinfecção, serão forçosamente diferentes quando se esterilizam explantes que são repicados pela primeira vez ou de explantes que já passaram por três ou quatro repicagens. Depende ainda da quantidade de inóculo no explante a desinfetar e das características do meio de proveniência e destino dos explantes repicados. O vigor/vitalidade é outro ponto muito importante, entre outros fatores como o estado fenológicos do material de origem.

1.1.3. Efeitos dos meios de cultura

Durante a realização deste trabalho utilizaram-se os meios de cultura MS, WPM e água de agar tendo-lhes sido adicionados várias substâncias tal como estão apresentados no capítulo dos materiais e métodos. Para se procurar perceber o efeito da composição dos meios de cultura no controlo das contaminações ao longo do tempo e o possível efeito oxidativo que poderão ter sobre os explantes, interessa especialmente observar estes parâmetros algum tempo após a instalação e/ou repicagem,

podendo as contaminações ser favorecidas por determinadas constituições dos meios quando as desinfecções superficiais são pouco efetivas.

Começou por se utilizar o **meio MS**. Nalguns dos meios preparados com base nesta receita foram adicionados um fungicida, fungistáticos, antibióticos, antioxidantes e um regulador de crescimento (BAP). Este meio foi só utilizado em instalações de explantes. No **MS1** observou-se um desenvolvimento muito rápido das contaminações que, ao final de 5 dias, já tinham proliferado sobre toda a superfície do meio. No **MS2**, o controlo das contaminações foi mais eficaz com menos de $\frac{1}{4}$ dos explantes contaminados ao final de cerca de duas semanas. No entanto a oxidação dos explantes foi muito rápida, registando-se apenas $\frac{1}{7}$ de explantes sãos ao final de 3 dias. No **MS3**, houve algum controlo das contaminações numa fase inicial, com cerca de $\frac{1}{4}$ de explantes livres ou com contaminações numa fase muito inicial ao final de cerca de 15 dias; no entanto, a longo prazo, todos os explantes apresentaram contaminações. Quanto à oxidação de tecidos, num período entre 7 a 10 dias, registou-se necroses desde $\frac{1}{4}$ à totalidade dos explantes instalados, em momentos diferentes, tendo-se revelado especialmente sensíveis os explantes menos vitais e/ou os explantes com origem em rebentos em estádios anteriores ao início do alongamento do eixo,. No **MS4**, as principais contaminações por fungos não foram controladas, tendo-se registado grandes taxas de contaminações. O melhor resultado registado foi aos 10 dias após instalação em que cerca de $\frac{1}{8}$ dos explantes não estavam contaminados. Quanto às oxidações, apenas cerca de $\frac{1}{5}$ dos explantes não apresentavam acastanhamento de tecidos ao final de cerca de 15 dias. No **MS5**, o sucesso no controlo das contaminações foi muito semelhante ao do **MS3**, embora, de forma geral, com percentagens mais elevadas de acastanhamento dos tecidos. No **MS6**, observou-se um estabelecimento relativamente rápido de contaminações, essencialmente por fungos, mas estas acabaram por não evoluir a longo prazo, tendo-se observado sensivelmente o mesmo estado de evolução das contaminações nos primeiros dias e cerca de duas semanas após instalação. Regista-se em alguns casos oxidação dos tecidos. No **MS7**, cerca de uma semana após instalação, todos os explantes apresentavam algum grau de contaminação por fungos e havia oxidação nos tecidos. Após 3 semanas de instalação, são eliminados cerca de metade dos tubos devido a contaminações e oxidações. No **MS8**, cerca de uma semana após instalação surgem contaminações. No longo prazo, as contaminações agravam-se registando-se muita presença de micélio e mesmo esporulações. Suspeita-se ter ocorrido alguma atividade dos gomos em explantes instalados neste meio.

Nestes meios, antes enumerados, utilizaram-se diferentes concentrações de sacarose, desde 30 g/l (**MS1**) a ausência de sacarose (**MS6**). Pela análise dos resultados tornou-se patente que as contaminações, embora pouco influenciadas, numa fase inicial, pelo fator concentração de sacarose, eram condicionadas a longo prazo pela concentração de açúcar no meio, evoluindo mais rapidamente com concentrações mais elevadas e estagnando a sua disseminação, a longo prazo, na ausência de sacarose.

No meio **MS2**, o tiocianato de potássio (KSCN) foi dos suplementos acrescentados aos meios, o que melhor controlou as contaminações. Contudo, foi também responsável pela rápida e completa oxidação de todos os explantes instalados. Quando se adicionaram ao meio MS o antibiótico cefotaxima (**MS4** e **MS5**), as contaminações não aparentaram terem sido melhor controladas a não ser quando a

ação do antibiótico era conjugada com a ação de um fungicida (neste caso o carbendazime) (**MS5**), uma vez que as contaminações eram maioritariamente devidas a fungos. Romano (1994) também complementou os meios de cultura com antibióticos, tendo considerado que estes limitaram o crescimento de microrganismos mas não se revelaram eficazes na sua eliminação. Nestes meios de cultura, o melhor controlo das contaminações, sem comprometer o estado de vitalidade do explante, foi obtido quando ao meio era adicionado um fungicida (**MS3**, **MS5**, **MS7** e **MS8**).

Nos meios MS, mesmo quando se conseguia um controlo razoável das contaminações a longo prazo, os explantes oxidavam muito, sugerindo por isso que este meio seja responsável por um elevado stress oxidativo. Outros autores consideraram este meio, mais concentrado em macronutrientes, inapropriado para a cultura de tecidos com origem em material adulto, tanto no sobreiro (Manzanera e Pardos, 1990; Carvalho, 1992; Romano, 1994) como noutras espécies do género *Quercus* (Chalupa, 1993), tanto devido à sua toxicidade para os tecidos como à falta de viabilidade das culturas instaladas neste meio.

Os antioxidantes adicionados ao meio **MS7** revelaram ser pouco eficazes na prevenção de oxidações (embora sejam necessárias mais repetições de ensaios). A adição de antioxidantes ao meio de cultura, em trabalhos anteriores (Romano e Martins-Loução, 1992; Romano, 1994), não revelou qualquer efeito positivo no controlo da oxidação e exsudação de fenóis em explantes de material adulto de *Q. suber*.

Alguns autores (Manzanera e Pardos, 1990; Romano *et al.*, 1992a; Romano, 1994) relataram boas percentagens de crescimento e maior reatividade dos explantes de material adulto de sobreiro instalado em meios com BAP. No presente trabalho, quando se complementou o meio com BAP (**MS8**) suspeita-se ter havido alguma atividade a nível dos gomos. Contudo, e talvez porque o meio tinha uma concentração apreciável de sacarose (20 g/l) as contaminações desenvolveram-se bastante, o que poderá ter afetado, mesmo que de forma indireta, a atividade do rebento e a suposta atividade do gomo.

Durante a realização deste trabalho utilizou-se também o **meio nutritivo WPM**, com menor concentração salina que o meio MS, tendo-se adicionado a estes meios um fungicida, um antibiótico e uma hormona de crescimento vegetal (BAP). Este meio foi utilizado tanto em instalações como para repicagens. No **WPM1**, no que toca às instalações, no prazo de uma semana surgem as primeiras contaminações que se foram agravando ao longo do tempo, surgindo grandes quantidades de micélio e mesmo esporulações. Ainda assim, nalguns explantes, suspeita-se ter havido vestígios de atividade fisiológica. Nas repicagens registou-se ressurgimento de contaminações em 4 dias e aos 15 dias após repicagem os explantes estavam cobertos de micélio com esporulação. Nesta altura, eliminaram-se os explantes mais contaminados e alguns dos que se apresentavam mais livres de contaminações, que foram novamente repicados, continuavam manifestar alguns sinais de evolução dos gomos (intumescimento). Contudo, estes explantes acabaram por senescer pouco tempo após esta repicagem. No **WPM2**, utilizado apenas em repicagens, ao final do primeiro dia já era possível observar-se micélio junto ao pé dos explantes, onde havia mais açúcar disponível. O intervalo entre repicagens era curto, rondando os 4 dias. No **WPM3**, também utilizado exclusivamente para repicagens, num período de 4 dias os explantes não apresentam contaminações mas perdem vitalidade. Cerca de uma semana após a segunda ou terceira repicagem, os explantes são eliminados devido a contaminações

e a oxidação dos tecidos. No **WPM4**, nas instalações, nos primeiros dias surgem contaminações junto ao pé do explante, onde o inóculo encontra mais açúcar e nutrientes disponíveis, que evoluem rapidamente, sendo os primeiros explantes eliminados ao final da primeira semana (material do início do verão). Relativamente às repicagens, os intervalos entre estas voltou a rondar os 4 dias.

Nestes meios registou-se a mesma tendência relativamente à concentração de açúcar no meio que tinha sido registada anteriormente nos meios MS. Optou-se por se utilizar o fungicida carbendazime, tendo igualmente em conta as observações anteriores no meio MS. No meio **WPM3** ainda se acrescentou um antibiótico (rifampicina) pois nalguns dos explantes provenientes sobretudo dos ramos colhidos em agosto e setembro, que passaram por um tratamento diferente, estando os fungos melhor controlados, surgiam frequentemente, a par de algumas contaminações por fungos, colónias de bactérias, o mesmo acontecendo em alguns explantes repicados da água de agar.

Como visto anteriormente, os meios de baixa concentração em sais, como o WPM, são amplamente utilizados e preferidos aos meios com concentrações salinas elevadas, na micropropagação de rebentos com características adultas em espécies do género *Quercus* e em particular no sobreiro. Neste trabalho, quando se passou a utilizar este meio nutritivo em vez do MS, registou-se melhorias nos níveis de oxidações dos tecidos vegetais *in vitro*. Esta diferença não terá sido maior, eventualmente porque os explantes colocados sobre estes meios provinham, na maioria, de material colhido em alturas de menor atividade das árvores ou de explantes já instalados em meio MS ou em água de agar que precisaram, por algum motivo, ser transferidos para meio fresco.

Uma vez que se pensa ter havido algum intumescimento dos gomos no meio **MS8** complementado com BAP, aos meios WPM foram, na sua maioria, adicionados BAP. Com este procedimento, nalguns dos explantes instalados nestes meios, voltou-se a assumir um ligeiro intumescimento dos gomos antes dos explantes acabarem por senescer e/ou serem afetados por severas contaminações. Observou-se ainda uma concentração dos explantes mais reativos entre o material vegetal colhido numa altura do ano em que as árvores apresentam maior atividade, que apresentava melhor vitalidade na altura da instalação. Alguns destes meios foram ainda aproveitados para repicar explantes que apresentaram atividade enquanto estiveram instalados em água de agar, para que a muito baixa concentração ou mesmo ausência de açúcar e nutrientes nesse substrato não afetasse a evolução dos gomos. Contudo, nestas culturas acabaram por se desenvolver muitas contaminações e alguns fenómenos de oxidação, até então moderadamente controladas nas formulações de água de agar. Não obstante, as contaminações nestas situações manifestaram-se de forma mais lenta numa fase inicial.

Uma vez que se obteve algum sucesso nos meios sem açúcar e com fungicida, decidiu-se começar a instalar fundamentalmente em meio de **água de agar** adicionando-lhe sempre o fungicida carbendazime, só se repicando para novo meio nutritivo com açúcar, por vezes, complementado com BAP para promover o crescimento, quando se suspeitava de alguma atividade ao nível dos gomos. Por estas razões, os meios com base na água de agar também foram aproveitados para repicagens. Para além do fungicida, a algumas formulações de água de agar foram também adicionados antibióticos. O **AA1** foi utilizado especialmente nas repicagens de explantes anteriormente instalados em água de agar que apresentavam algumas contaminações por colónias de bactérias, sobretudo sobre nas zonas de acumulação do Zetaminol, na tentativa de as controlar. No período de aproximadamente duas semanas

as contaminações pareciam controladas. Alguns destes explantes foram novamente repicados após um período de uma semana por se suspeitar de que havia evolução dos gomos. No **AA2**, relativamente à oxidação de tecidos e às contaminações, os resultados foram mistos, dependendo em parte da vitalidade dos explantes. Nos melhores casos, os explantes permaneceram um mês sem contaminações enquanto nos piores casos as contaminações surgiam cerca de 15 dias após repicagem. Quando as contaminações surgiam mais cedo eram essencialmente causadas por fungos, enquanto aquelas que surgiam mais tarde estavam muitas vezes relacionadas com o aparecimento de bactérias para além de alguns fungos. As contaminações surgiam também muitas vezes associadas a tecidos vegetais oxidados. A oxidação observou-se em primeiro lugar nos explantes fenologicamente mais atrasados (eixos menos alongados no estádio de orelha-de-rato, por vezes em folha visível) e começavam por libertar fenóis para o meio (muitos explantes usados neste meio apresentavam uma coloração avermelhada). Na pior situação, após uma semana cerca de 1/3 dos explantes encontravam-se necrosados. Na melhor situação, observou-se uma progressiva perda de vitalidade dos explantes até estes começarem a necrosar e serem eliminados, muitas vezes sem contaminações. Nalguns dos explantes instalados no **AA2** pensa-se ter havido intumescimento dos gomos axilares ao final de 15/20 dias.

No **AA3** e no **AA4** adicionou-se uma baixa concentração de açúcar. O objetivo destes meios foi dar o mínimo de açúcar para que o explante reagisse e evoluísse mas sem que as contaminações se descontrolassem e acelerassem a senescência dos tecidos vegetais. Uma vez que o meio **AA3** tinha cefotaxima, um antibiótico algo tolerado pelas plantas, realizou-se uma experiência inicial em que os explantes eram mantidos neste meio durante 18 e 24 horas. As diferenças perceptíveis entre estas duas durações não foram muito expressivas, tendo-se adotado as 24 horas de duração essencialmente por comodidade de horário. No final deste período, os explantes eram repicados para meio idêntico mas sem cefotaxima. Nessa altura, de forma geral, os explantes apresentavam-se vitais, sem contaminações só se tendo registado alguma oxidação na zona de corte do explante. Esta metodologia foi eficaz no controlo das colónias de bactérias nas primeiras duas semanas após os explantes terem sido repicados para meio sem cefotaxima. Depois, as colónias começavam por surgir essencialmente sobre o explante alastrando mais tarde para o meio. O **AA3** foi usado sobretudo em instalações mas também em repicagens de alguns explantes colonizados por bactérias. O meio **AA4** teve sucessos variáveis conforme as características dos explantes repicados. Os explantes repicados para este meio tinham duas origens: os explantes provenientes de meio idêntico mas com cefotaxima e explantes contaminados. Nos primeiros, no decorrer da semana posterior à repicagem, surgiam os primeiros sinais de fungos. Estas contaminações iam evoluindo e após mais uma semana registavam-se também, em alguns casos, colónias de bactérias, sendo os explantes novamente repicados. Nos explantes repicados especialmente devido a contaminações por bactérias, estas, nos primeiros 5 dias, reapareciam nos mesmos explantes anteriormente contaminados. Registavam-se também novos mas poucos casos de contaminações por micélio. Os explantes começam a perder gradualmente a vitalidade (libertando fenóis) ao longo das sucessivas repicagens, tendo-se registado um declínio dos explantes embora as contaminações parecessem mais controladas.

No meio **AA4**, os intervalos entre repicagens de explantes com as duas origens variam entre 15 e 5 dias sendo que este intervalo diminui à medida que a área de tecido necrosado aumenta. Neste meio encontravam-se alguns explantes com diâmetros do caule superiores (entre 3 e 5mm) aos diâmetros dos caules dos explantes que normalmente se selecionavam para instalação (até 2mm aproximadamente), tendo observado a desidratação das zonas apicais, após cerca duas semanas. Também nos explantes instalados no **AA3** e repicados para o **AA4**, supõe-se ter havido alguma atividade a nível dos gomos entre 15 e 30 dias após estas repicagens.

Das observações dos meios de água de agar pode-se tirar que as contaminações são tanto causada por fungos como por outros microorganismos, como bactérias, apresentando, contudo, os fungos uma disseminação mais rápida, mas melhor controlada nestes meios sem fontes de carbono. Este poderá ter sido um dos motivos pelo qual, nos meios **WPM** e **MS**, se registaram sobretudo contaminações por fungos, que terão eventualmente suprimido o aparecimento e evolução de outros microorganismos. Também se pôde constatar uma maior suscetibilidade dos explantes menos vitais e dos tecidos necrosados às contaminações.

O BAP é considerado eficaz na ativação do desenvolvimento de rebentos axilares, em concentrações e condições de temperatura adequadas (San-José *et al.*, 1988, 1990; Manzanera e Pardos, 1990; Puddephat *et al.*, 1997; El-Kbiach *et al.*, 2002a). Contudo, nos meios de água de agar em que não houve adição de BAP suspeitou-se ter ocorrido alguma atividade dos gomos, tal como tinha acontecido nos meios MS e WPM, suplementados com BAP. Isto poderá indicar alguma independência, pelo menos numa fase inicial, da atividade dos gomos relativamente à presença de BAP no meio, sendo os explantes capazes de iniciar, só por si, a atividade dos gomos.

Repicar o mesmo explante revelou ser um procedimento favorável no estabelecimento e na taxa de multiplicação de outras espécies de *Quercus* (San-José *et al.*, 1988; Vieitez *et al.*, 1993, 1994). Neste trabalho também se repicaram os mesmos explantes várias vezes (por vezes mais de três vezes), embora com objetivos diferentes (essencialmente para controlar contaminações e exsudação de fenóis) tendo-se verificado um declínio progressivo da sua vitalidade ao longo das sucessivas repicagens. Já Manzanera e Pardos (1990) e Romano e Martins-Loução (1992), em material adulto de *Q. suber*, conseguiram ultrapassar problemas com exsudação de fenóis repicando poucos dias após iniciação da cultura. A orientação horizontal dos explantes sobre o meio também parece ter um efeito benéfico na micropropagação de outras espécies de *Quercus* (San-José *et al.*, 1988; Vieitez *et al.*, 1993, 2009; Sanchez *et al.*, 1996). Porém, enquanto não se conseguir um procedimento eficiente no controlo das contaminações de explantes de *Q. suber* colhidos diretamente do campo, esta metodologia não conseguirá ser aplicada nesta espécie (especialmente em meios com açúcar), uma vez que quando colocados nesta posição, a severidade das contaminações aumentou, possivelmente devido à maior proximidade da fonte de açúcar.

Em resumo, e considerando a evolução *in vitro* de gomos, é de salientar diferentes aspetos. Os *Quercus* são muito pouco reativos *in vitro*, especialmente quando se utiliza material proveniente de árvores adultas, tentando-se sempre, nesses casos, utilizar material que retenha ou recupere

característica de juvenilidade (San-Jose *et al.*, 1990; Chalupa, 1993; Evers *et al.*, 1993; Vieitez *et al.*, 1993; Kartsonas e Papafotiou, 2007).

Os explantes que apresentaram mais sucesso no que toca à presumível atividade inicial dos gomos axilares, neste trabalho, tiveram origem em material vegetal colhido durante o período em que se regista maior atividade nos sobreiros em campo, nomeadamente em maio, e em ramos que foram colhidos já em agosto e setembro mas tratados de modo diferente (descrito nos materiais e métodos). Presumivelmente, os explantes cujos gomos terão intumescido apresentam alguma característica de juvenilidade e maior reatividade relativamente aos restantes explantes instalados, sendo o estágio de desenvolvimento do gomo um fator que pode influenciar a iniciação da cultura *in vitro* e o seu crescimento continuar a ser dominado por um controlo endógeno (Puddephat *et al.*, 1997).

Em termos de período necessário para a iniciação da cultura, em *Q. petraea* e *Q. robur* (Chalupa, 1993), registou-se o início do crescimento dos gomos axilares *in vitro*, 1-2 semanas após instalação, especialmente nos explantes com origem em jovens plantas. Já em *Q. suber*, Manzanera e Pardos (1990) registaram o início do desenvolvimento, com o intumescimento de gomos apicais e axilares de material de origem juvenil, 6 dias após a sua instalação, sendo os explantes de origem adulta menos propensos a evoluir. Nalguns casos, os novos rebentos atingiram 1 cm em apenas 2 semanas. O período de iniciação da cultura (desde a instalação até à primeira repicagem de novos explantes obtidos *in vitro*) em explantes com origem em material adulto de *Q. suber* é de cerca de quatro semanas (Romano e Martins-Loução, 1992; Romano, 1994).

Neste trabalho, a duração entre a instalação e o intumescimento dos gomos axilares dos explantes intervalou entre 15 dias e 1 mês. As maiores durações foram registadas em explantes instalados em outubro enquanto as durações mais curtas foram registadas essencialmente em explantes instalados em maio. Nos explantes instalados em maio procurou-se utilizar a seguinte metodologia, relativamente ao tipo de meios utilizados: os explantes eram mantidos em meio de água de agar (**AA2**) até haver indícios de intumescimento dos gomos axilares e depois repicados para meio nutritivo com açúcar (essencialmente **WPM1**). Numa destas datas instalou-se ainda, em meio nutritivo com açúcar (contaminações numa fase inicial pior controladas), explantes que acabariam por evoluir em períodos semelhantes e em alguns casos superiores aos registados nos explantes instalados em água de agar na mesma época. Já nos explantes instalados no final do mês de setembro e durante o mês de outubro os meios utilizados foram o **AA3** (24h) e o **AA4** que continham uma baixa percentagem de sacarose. Relativamente às desinfecções, estes explantes passaram pelos seguintes processos de desinfecção: **FunCarb**, **HCa2**, **HCa3**, **HCa6** (mês de maio), **Fun²Antiox2** e **Fun²Antiox3** (meses de setembro e outubro), a maioria destes estão entre os mais eficientes. Desta forma, a maior reatividade do material descrito aliado a processos de desinfecções e metodologias de instalação eficientes levaram ao intumescimento dos gomos.

Um aspeto relevante na instalação dos explantes, neste trabalho, diz respeito à sazonalidade. Os explantes instalados com origem em material que cresceu e se desenvolveu no campo entre finais de abril e finais de maio revelaram-se mais reativos, com menor libertação de fenóis e até, de forma geral, manifestaram menos contaminações *in vitro*. A partir de julho foi característica recorrente os explantes oxidarem logo após o corte aquando a sua preparação para a desinfecção superficial, antes de entrarem

na cultura de tecidos. As observações feitas neste trabalho, para material de árvores adultas instalado diretamente do campo, são contrastantes com os resultados obtidos por Romano (1994) que registou menor efeito de sazonalidade na instalação de culturas durante o verão em material de origem adulta (sendo de salientar que se tratava de material previamente acondicionado e tratado antes da instalação). No sobreiro já se descreveu um efeito de dependência entre a exsudação de compostos fenólicos e a viabilidade de crescimento dos explantes (Gonçalves e Rainho, 1992; Romano, 1994).

Algumas das diferenças aqui descritas entre processos de desinfecção, meios de cultura, ou até mesmo na reatividade dos explantes *in vitro*, poderão estar relacionadas com diferenças a nível do genótipo, amplamente retratadas neste género (Chalupa, 1993; Evers *et al.*, 1993; Gebhardt *et al.*, 1993; Meier–Dinkel *et al.*, 1993; Puddephat *et al.*, 1997; Vieitez *et al.*, 2009), e que, neste trabalho, não foram controladas.

1.2. Instalação *in vitro* de inflorescências femininas

Durante a realização deste trabalho tentou fazer-se a instalação de flores femininas *in vitro* como era objetivo primordial deste trabalho.

Entre os novos crescimentos presentes nalguns dos ramos colhidos durante o mês de maio, encontraram-se algumas inflorescências femininas em vários estádios de desenvolvimento diferentes, entre o início da recetividade e a plena recetividade. Uma vez que não se conhece o comportamento destas flores *in vitro* decidiu-se instalá-las a todas, independentemente do seu estágio de desenvolvimento. Estas flores foram instaladas em meios nutritivos com açúcar (instaladas em **MS7**, **MS8** e repicadas para **WPM2** e **WPM4**). A maioria destas inflorescências passaram pelo processo de desinfecção **FunCarb** e algumas pelo **HCa3**. As flores instaladas com estigmas recetivos que passaram pelo **HCa3** apresentavam estigmas secos no primeiro dia após instalação, sendo este um processo agressivo para a viabilidade dos estigmas, e começavam a surgir contaminações por fungos junto aos pés dos explantes. Após cerca de uma semana os estigmas estavam pretos e necrosados. Após três semanas as flores foram eliminadas pois apresentavam muitas contaminações. As flores que passaram pelo **FunCarb**, 3 dias após instalação foram repicadas devido a algumas contaminações, para o mesmo meio e para serem seguidamente polinizadas, já não no âmbito deste trabalho. Nesta altura alguns dos estigmas que tinham sido instalados recetivos começavam a desidratar. 3 dias depois fez-se o reforço da polinização. Parte das flores estavam em plena recetividade e outra parte a passar a recetividade. Observou-se ainda uma pequena percentagem de flores necrosadas que acabariam por ser eliminadas. Quanto às contaminações, nesta data eram visíveis junto aos pés das espigas início de contaminações por fungos. 4 dias depois os explantes foram repicados devido às contaminações. Em intervalos semelhantes as espigas foram repicadas mais duas a três vezes, acabando por ser eliminadas devido a necroses dos tecidos e ao excesso de contaminações que se desenvolviam sobre as flores.

Dos 6 segmentos de ramos colhidos durante o mês de maio, conseguiram-se apenas instalar cerca de 13-17 espigas. A escassez de inflorescências femininas disponíveis impossibilitou assim a otimização dos procedimentos.

2. Fenologia e biologia reprodutiva do sobreiro

2.1. Caracterização climática

Através da análise dos dados climáticos no gráfico termopluviométricos da figura 4 podem-se observar que as temperaturas médias do período considerado pouco se desviaram do normal sendo apenas de registar um aumento ligeiro das temperaturas nos meses de verão (+0,35°C em julho e +0,75°C em agosto), um aumento de 1,5°C no mês de janeiro e 1,35°C no mês de outubro e uma diminuição das temperaturas no mês de maio (-0,95°C). Já nas precipitações mensais ocorridas no mesmo período, podem-se identificar grandes diferenças especialmente nos meses de março, maio, outubro e novembro. Nos meses de março e outubro registaram-se valores de precipitação muito superiores (março +141,5 mm e outubro +85,7 mm) aos valores normais de referência nesta região para esta altura do ano. Quanto aos meses de maio e novembro o cenário foi inverso registando maio uma diminuição de 40,8 mm e novembro uma diminuição de 108,2 mm tendo-se estes meses tornado secos com a barra da precipitação a ficar abaixo da curva das temperaturas. Quanto ao mês de setembro nada se pode afirmar com muita certeza mas, a avaliar pela evolução normal da temperatura, este mês terá sido um mês invulgarmente húmido nesta região.

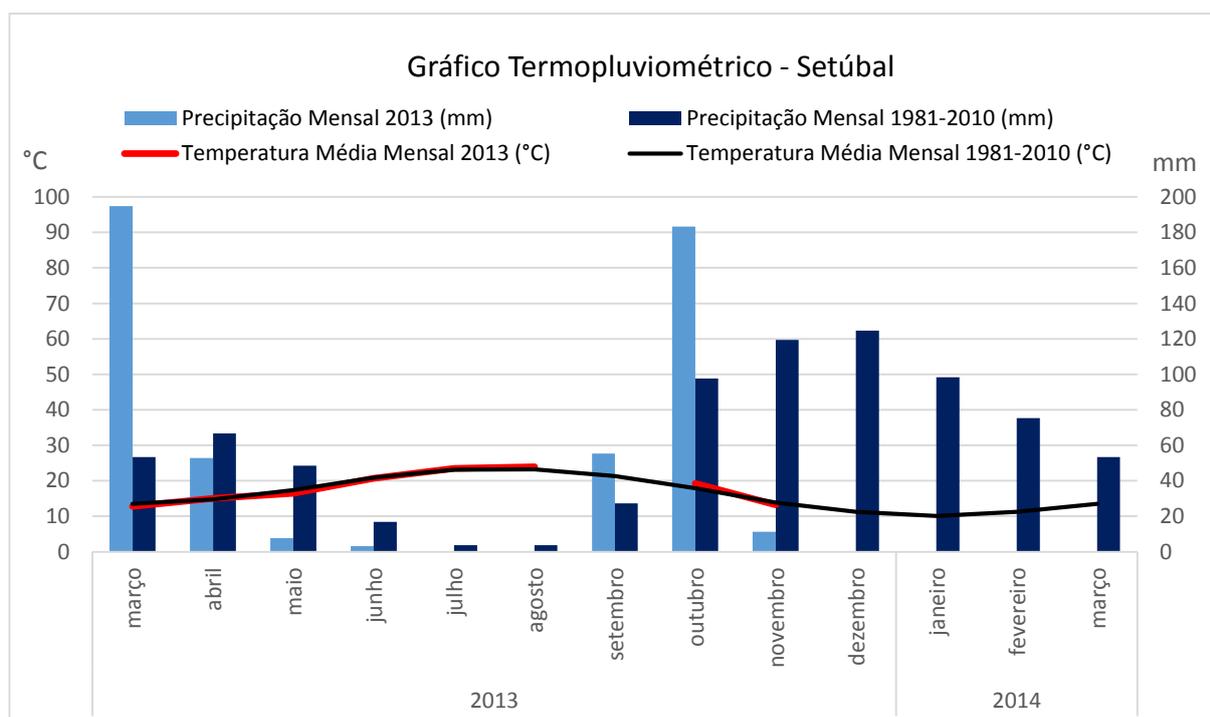


Figura 4: Gráfico termopluviométrico de Setúbal. No gráfico encontram-se os valores das precipitações mensais e das temperaturas médias mensais do período em que se fez o acompanhamento fenológico da parcela (março de 2013 a março de 2014), comparados com os valores das normais climatológicas do período de 1981 a 2010 (dados provisórios) nos respetivos meses. A ausência dos dados relativos às temperaturas nos meses de setembro de 2013 e nos meses de janeiro a março de 2014 e à precipitação entre dezembro de 2013 e março de 2014 traduz a sua indisponibilidade. Dados obtidos no site do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (<http://www.ipma.pt/pt/> - acedido entre 29/09/2014 e 02/10/2014).

2.2. Fenologia

A caracterização fenológica da componente vegetal dos ecossistemas terrestres pode contribuir eficazmente para a compreensão do seu funcionamento, pois cada estágio fenológico reflete, em geral,

o modo como a planta e a comunidade exploram, na sucessão das estações climáticas, os períodos favoráveis para a aquisição de carbono e para o investimento em crescimento e reprodução (Oliveira, 1995).

Através da análise dos gráficos da evolução da fenologia durante o ciclo considerado (figura 5), pode-se observar a evolução foliar e reprodutiva do sobreiro na parcela Quinta da Serra localizada na zona de Azeitão e em particular da árvore 3.

Relativamente à evolução vegetativa do sobreiro neste ciclo, a quebra de dormência dos gomos observou-se em meados de abril, embora na árvore 3 apenas se tenha verificado no final desse mês, com o intumescimento dos gomos (alongamento das escamas). Nesta altura a árvore encontra-se em conforto hídrico e as temperaturas aumentaram progressivamente desde fevereiro, rondando os 15°C a temperatura média do mês de abril. Seguiram-se os estádios de gomo lanudo e folha visível. Estes três últimos estádios são difíceis de encontrar à vista desarmada em árvores altas e com copas amplas que, muitas vezes, apresentam parte da sua superfície (normalmente a face mais exposta ao sol) fenologicamente um pouco mais avançada havendo, por estes motivos, grandes sobreposições nas durações destes estádios. Como seria de se esperar quando se considerou o conjunto de árvores da parcela as durações destes estádios foram superiores às registadas na árvore 3. Contudo o início e durações das duas fases seguintes (orelha-de-raro e folha expandida não atempada) na árvore 3 foi muito idêntica à média da parcela, tendo estes períodos ocorrido durante o mês de maio. No início de junho observa-se por fim a maturação das folhas (folha atempada), mês em que as temperaturas médias rondaram os 20°C tendo chovido muito pouco no mês de maio. Durante este período aqui considerado, são observados pequenos surtos de crescimento, analisados no ponto a seguir. Comparando a árvore 3 com a média das árvores da parcela pode-se considerar que este período de desenvolvimento foliar foi bem mais extenso na árvore 3, tendo-se prolongado até início de dezembro enquanto na parcela este período terminou em meados de setembro. A dormência considerou-se a partir do momento em que o novo crescimento passou a ser irrelevante ou mesmo inexistente o que coincidiu com as descidas das temperaturas e com os meses normalmente mais frios nesta zona.

O sobreiro é uma espécie protândrica, surgindo as inflorescências masculinas antes das femininas, de gomos reprodutivos (só masculinos) ou mistos (com meristema reprodutivos e vegetativos) (Varela e Valdivieso, 1996), normalmente na mesma altura em que se verifica o abrolhamento dos gomos vegetativos, ou até antes (Oliveira *et al.*, 1994; Cabral, 1996).

No ano 2013, a floração masculina foi observada em meados de abril na média da parcela e em finais de abril na árvore 3 tendo terminado no final de maio, embora um pouco mais cedo na árvore 3 do que na média da parcela. A deiscência das anteras deu-se entre o início e meados de maio na árvore 3 (durante cerca de uma semana) e no conjunto das árvores da parcela durou desde o início de maio até quase final de maio (durante pouco mais de duas semanas).

Já as inflorescências femininas, surgem (estádio Df) nas axilas das novas folhas (gomos mistos) (Varela e Valdivieso, 1996), normalmente no estágio vegetativo orelha-de-rato, depois das folhas se destacarem do eixo principal, tornando-se as axilas mais expostas.

A floração feminina na parcela durou desde inícios de maio até meados de junho de 2013 e voltou a ser de duração inferior quando apenas se considerou a árvore 3. A plena recetividade deu-se

sobretudo em meados de maio na árvore 3 mas na parcela este período registou-se uns dias mais tarde, no final do mês de maio tendo durado durante mais tempo (cerca de duas semanas) na parcela do que na árvore 3 (cerca de uma semana).

No que diz respeito ao comportamento reprodutivo, no ciclo acompanhado, a árvore 3 revelou ser um dos indivíduos mais precoces na parcela, tendo atingido cedo a plena libertação de pólen e precocemente a plena recetividade estigmática, relativamente à média da parcela. Quanto à evolução do ciclo vegetativo a árvore 3 iniciou o seu desenvolvimento mais tarde, tendo igualmente terminado mais tarde o seu desenvolvimento, assinalando um período de atividade vegetativa maior relativamente à média da parcela.

As disparidades nas durações das florações tanto masculinas como femininas quando se compara a parcela com a árvore 3 indicam que as florações, dentro desta população, não ocorrem de forma sincronizada entre as árvores, levando a que haja uma dilatação dos períodos quando se considera um universo de 31 árvores. As variações entre indivíduos numa mesma população já foi documentado antes nesta espécie (Carvalho *et al.*, 1999). É também de se notar que a deiscência das anteras começou antes da plena recetividade dos estigmas e terminou antes desse período tanto na parcela, tendência já registada antes (Sá, 1995), como na árvore 3, o que significa que as últimas flores femininas, ou não são polinizadas ou recebem pólen de árvores exteriores à parcela, podendo mesmo ocorrer fenómenos de hibridações nomeadamente com outras espécies de *Quercus* (Boavida *et al.*, 2001; Varela *et al.*, 2008).

Estudos anteriores sobre o comportamento reprodutivo nesta população de sobreiros da Quinta da Serra, revelaram variabilidade individual elevada, variabilidade de árvore para árvore e variabilidade na mesma árvore ao nível dos anos (Sá, 1995; Reforço, 1997; Moreira, 2005). Foi igualmente reportada uma variabilidade no comportamento da parcela, como um todo, ao longo dos anos (Moreira, 2005).

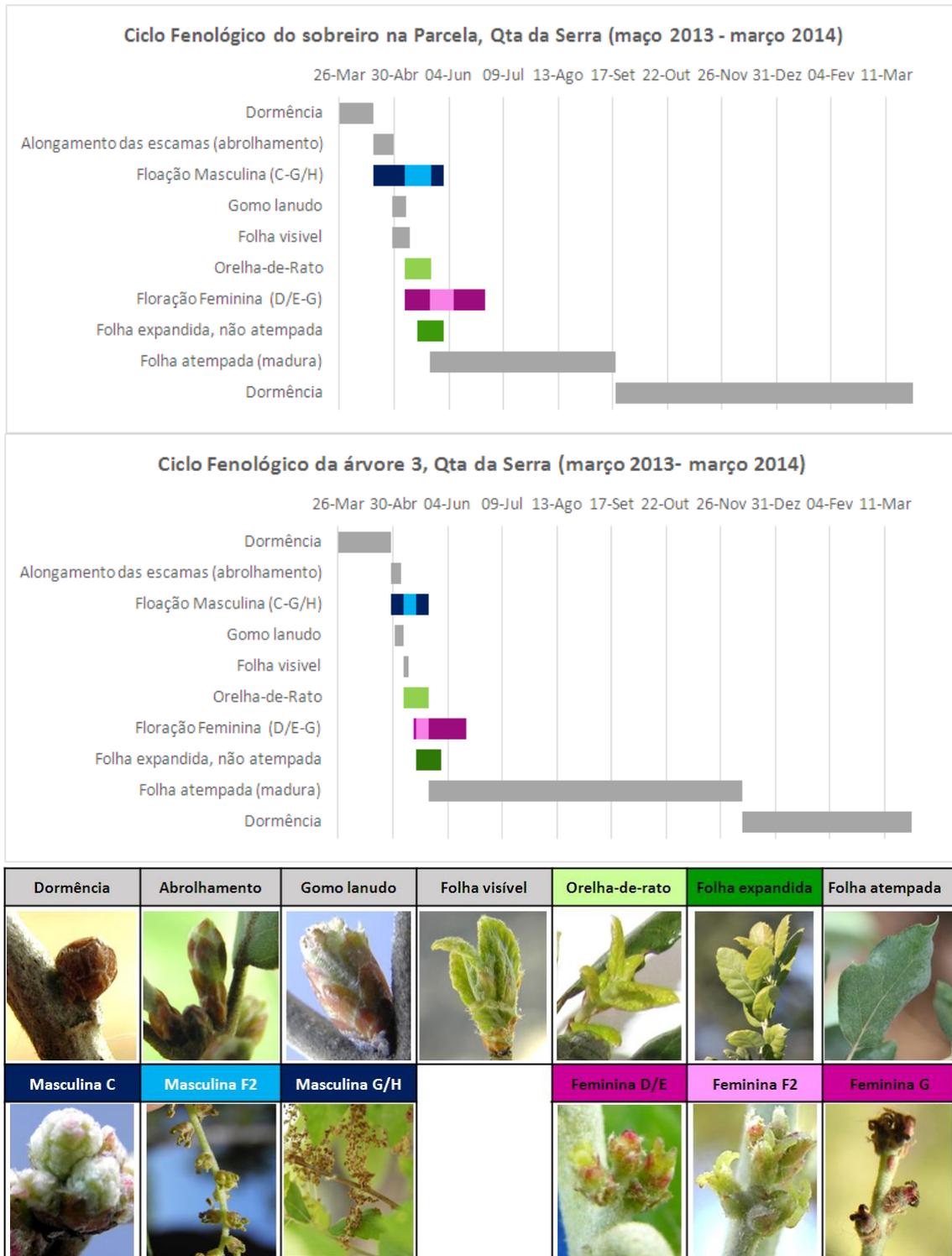


Figura 5: Ciclo fenológico dos sobreiros estudados na Quinta da Serra e em particular da árvore 3, no período de março de 2013 a março de 2014 e fotos dos estados fenológicos considerados. Consideram-se os estádios de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo (apenas os mais relevantes), desenvolvidos por Varela e Valdivieso (1996 e 2011). A evolução da fenologia vegetativa é representada pelas barras cinzentas com exceção dos estádios de orelha-de-rato (verde claro) e folha expandida não atempada (verde mais escuro) que são tidos como indicadores do início do desenvolvimento da flor feminina coincidindo com os períodos de máxima recetividade. A barra azul representa o período de evolução de alguns dos estádios da flor masculina sendo a antese (F2m) destacada com um azul mais claro. A barra rosa representa a floração feminina desde o estádio em que já é possível existirem estigmas recetivos (estádio Ef), até ao estádio em que perdem por completo a sua recetividade (estádio Gf). Nesta barra o período da plena recetividade estigmática (F2f) é identificado com um rosa mais claro.

2.2.1. Evolução do ciclo vegetativo

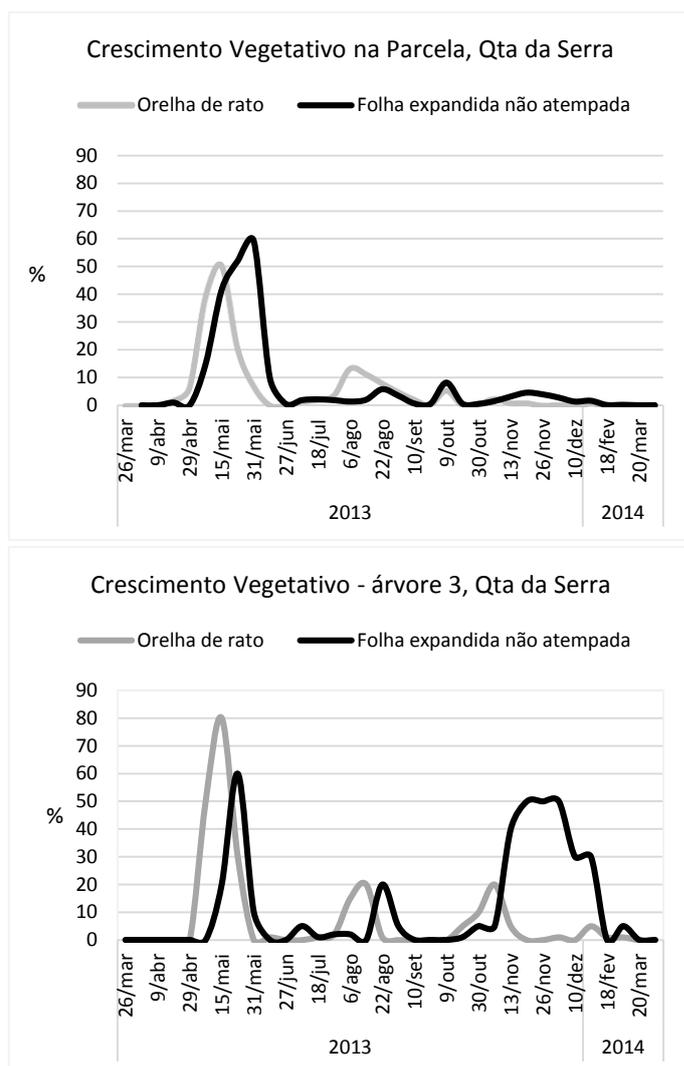


Figura 6: Evolução do crescimento vegetativo de março de 2013 a março de 2014, no conjunto das árvores em estudo na Quinta da Serra (em cima) e na árvore 3 (em baixo).

Nos gráficos da figura 6 encontra-se a evolução do crescimento vegetativo no período estudado tendo-se considerado para isso as fases fenológicas de orelha-de-rato e folha expandida não atempada pois é só a partir destes estádios que se consegue ter um ideia mais acertada do crescimento efetivo em copas frondosas de árvores que podem atingir algumas dezenas de metros de altura. Consideram-se dois estádios subsequentes para que se conseguisse abranger um período de crescimento maior diminuindo assim o risco de não se registar um surto de crescimento no intervalo entre observações e para se ter uma melhor perceção da sua verdadeira importância.

Durante este ciclo fenológico acompanhado identificam-se então pelo menos três picos marcados de crescimento vegetativo. Tanto na parcela como na árvore 3 o período em que se registou maior atividade vegetativa iniciou-se no final de abril e prolongou-se por quase todo mês de maio. Esta é a época normal e regular de

crescimento após um longo período de dormência e repouso vegetativo sendo preferencialmente esta a época de floração do sobreiro (Varela, 1994; Feijó *et al.*, 1999).

O sobreiro é uma espécie quiescente que apresenta um crescimento vegetativo descontínuo, exibindo desta forma surtos de crescimento ao longo do seu ciclo anual (Natividade, 1950) sempre que se reúnam condições favoráveis. No ciclo em estudo foram registados outros surtos, para além daquele normalmente observado nos meses de primavera. Analisando o gráfico da parcela vale a pena referir a subcontinuidade de crescimento vegetativo enfatizada pelos vários surtos registados, nomeadamente, no início dos meses de agosto e outubro. Analisando o gráfico da árvore 3 (figura 6) registou-se igualmente um surto de crescimento no início do mês de agosto (com maior peso nesta árvore relativamente à média da parcela) e outro surto muito relevante no final de outubro e novembro. Comparando agora estes resultados com os registos meteorológicos (figura 4) pode-se tentar estabelecer uma relação entre o crescimento registado no mês de outubro, especialmente na árvore 3,

com as temperaturas mais elevadas do que o habitual neste mês e com a abundância de água (que já vinha do mês de setembro que tudo aponta para que tenha sido um mês anormalmente húmido) embora este último ponto não possa ser apontado como um fator que levou ao surto de crescimento registado em agosto. Estes surtos de crescimento durante os meses de verão são frequentemente referidos na bibliografia associados, por vezes, a episódios de floração feminina (Natividade, 1950; Varela, 1994; Sá, 1995; Feijó *et al.*, 1999). As observações feitas na primavera e no início do outono estão de acordo com as realizadas por Oliveira *et al.* (1994) que registaram dois grandes períodos de crescimento ativo: um primeiro e maior entre abril e junho, suportado possivelmente pela acumulação de reservas durante o inverno e a alta taxa de atividade fotossintética na primavera, e um segundo no início do outono, após as primeiras chuvas outonais, com menor expressão possivelmente devido a uma depleção das reservas consequência da baixa produção fotossintética no verão e do investimento na maturação dos frutos. Segundo Pinto (2013), a temperatura do ar é o fator mais importante para o abrolhamento dos gomos na primavera (temperatura base 6,2 °C e 323 graus-dias acumulados depois de 25 de março), sendo o crescimento vegetativo altamente dependente da temperatura do ar e da disponibilidade de água antes e durante o período de crescimento ativo. O desenvolvimento destes lançamentos é mais acelerado com temperaturas médias e máximas do ar mais elevadas nas semanas após o abrolhamento, dentro dos limites do fotoperíodo.

Nestes surtos de crescimento registou-se também a ocorrência de florações femininas e masculinas. As femininas surgiram durante o mês de agosto enquanto as masculinas surgiram durante o mês de outubro, incluindo na árvore 3. Observações de campo feitas aos amentilhos na árvore 3 sugerem que estas flores masculinas, que no aspeto morfológico eram normais, não apresentavam muito pólen nas anteras. No entanto tem que se considerar que este mês foi muito chuvoso, podendo isto ter exercido um efeito negativo na dispersão do pólen nesta espécie anemófila (Jato *et al.*, 2002). Quanto às flores femininas observadas noutras árvores da parcela, nada de anormal se registou quanto à sua viabilidade. Estes episódios de “florações atípicas” são frequentes nesta espécie (Natividade, 1950; Corti, 1955; Elena-Rossello *et al.*, 1993; Varela, 1994; Sá, 1995; Boavida *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999; Patrício, 2004; Gómez-Casero *et al.*, 2007).

No contexto deste trabalho este tipo de florações podem assumir um papel relevante uma vez que as flores femininas poderiam ser aproveitadas para instalar *in vitro* havendo mesmo, nalguns casos em que apenas se regista floração feminina, menos probabilidades de contaminações dos estigmas com pólen. Contudo, estas florações nem sempre ocorrem (sendo, desta forma, ainda mais difíceis de detetar) e, também por esse motivo, pouco se sabe acerca da sua viabilidade (Varela, 1994; Patrício, 2004). Teria ainda que se ter atenção a possíveis flores hermafroditas, que, embora não tenham sido observadas no período em estudo, são mais prováveis de surgir nestes episódios atípicos de floração (Natividade, 1950; Feijó *et al.*, 1999).

2.2.2. Fenologia e ontogenia de estruturas reprodutivas

Um dos objetivos do trabalho foi estabelecer uma relação entre o aspeto exterior durante a evolução fenológica reprodutiva e a evolução ontogenética. Nesta secção tenta-se, através de fotografias morfológicas e anatómicas, associar um determinado aspeto exterior a algumas das fases mais relevantes na evolução ontogénica das peças florais femininas e mais tarde dos frutos. São assim

apresentadas fotografias de flores femininas e de frutos durante estádios de desenvolvimento fenológico definidos anteriormente pelas autoras Sá (1995) e Varela e Valdivieso (1996, 2011), assim como fotografias de cortes histológicos de peças florais e frutos nesses mesmos estádios de desenvolvimento fenológico.

Na figura 7 podem-se encontrar os estádios de desenvolvimento fenológico da flor feminina desde que os estigmas/estiletes emergem com capacidade recetiva (estádio Ff) até que senescem e se tornam residuais (estádio Hf). Nas figuras 8 e 9 podem-se observar cortes histológicos longitudinais dos estádios presentes nas fotografias da figura 7. Através de uma análise comparativa destas figuras podem-se fazer algumas considerações.

Durante a polinização a flor feminina (estádio F2f) apenas apresenta os estigmas e estiletes diferenciados (figura 7.B e figura 8.A-C) podendo ser encontrada, num ovário ainda incipiente, uma cavidade (figura 8.A) onde mais tarde se diferenciarão os lóculos e os óvulos. Nesta fase consegue-se também distinguir o tecido transmissivo (tecido de ligação entre o estigma, o estilete e os óvulos) que se prolonga até ao local onde o ovário se está a diferenciar (figura 8.A). Estas observações diferem das de Boavida *et al.* (1999) que, na altura da polinização, o tecido transmissivo diferenciado estava confinado à zona de fusão dos estiletes tendo posto a hipótese da diferenciação dos tecidos abaixo deste nível estar dependente das etapas finais do desenvolvimento do ovário. Pode-se, contudo, afirmar que até esta fase a flor feminina completou apenas a formação dos tecidos das estruturas responsáveis pela aderência e germinação dos grãos de pólen e crescimento inicial dos tubos polínicos.



Figura 7: Evolução fenológica da floração feminina na parcela estudada na Quinta da Serra em 2013. **A** - Espiga constituída por três flores no estágio fenológico Ff em finais de abril/início de maio. Nesta fase são perceptíveis os estiletes com estigmas de cor amarelada a acastanhada a emergirem do perianto; **B** - Espiga com flores no estágio fenológico F2f, em plena recetividade estigmática (intumescidos em posição divergente, aspeto brilhante e viscoso) em meados de maio (durando até finais de maio a início de junho); **C** - Flores no estágio fenológico Gf em finais de maio. Este estágio, nalguns casos, durou até finais de junho sendo caracterizado pela perda de recetividade dos estigmas que vão necrosando; **D** - Em finais de junho a maioria das flores apresentavam estigmas completamente necrosados (castanho-escuro), altura em que se começa a considerar a fase Hf; **E-G** - A fase Hf foi a mais longa tendo começado em finais de junho e durado até meados de agosto (nalguns casos até finais de agosto). Considerou-se esta fase desde que os estigmas perderam por completo a recetividade (figuras E e F), seguindo-se um aumento de volume na zona do ovário (figura G), até a cúpula se tornar manifestamente mais estreita na base do que na zona onde envolve o ovário adquirindo formas aproximadamente obovoides. A cúpula nesta fase envolve por completo o ovário restando apenas estiletes e estigmas residuais, por vezes soldados, da parte de fora (figura G). Na figura F podem-se ver grãos de pólen sobre estigmas sem recetividade em flores no final de junho. (Cp = cúpula; P = perianto; PG = grão de pólen; St = estigmas. Escala das barras: 1 mm).

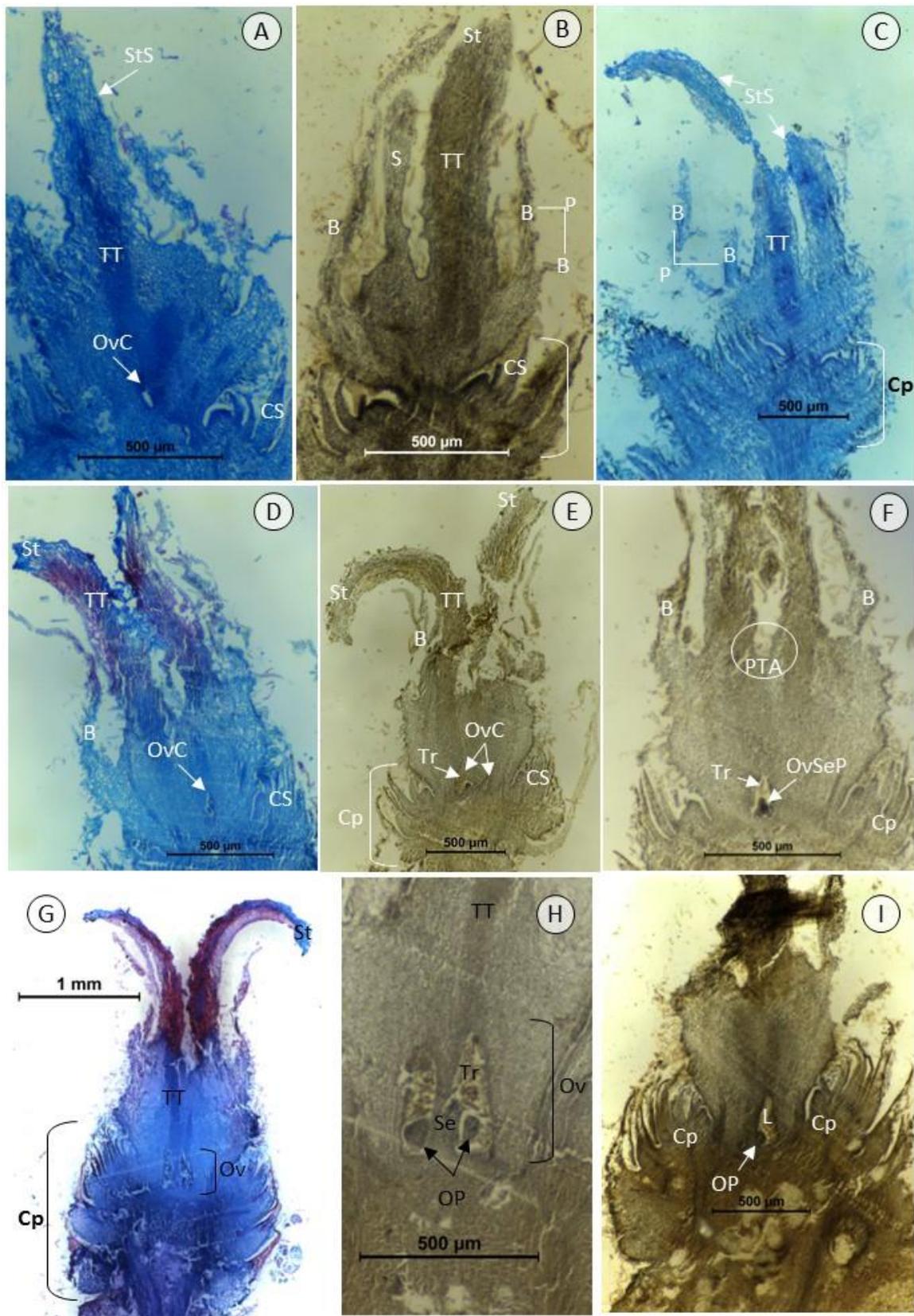


Figura 8: Cortes histológicas longitudinais de flores femininas da árvore 3 nos estádios fenológicos F2f (A, B e C flores colhidas a 23/05/2013) e Gf (D, E e F flores colhidas a 31/05/2013, G e H a 27/06/2013 e I a 20/06/2013). **A-C** - Nesta fase do desenvolvimento da flor apenas se conseguiu encontrar a cavidade do ovário ainda sem nenhuma estrutura diferenciada. Os estigmas estão recetivos (coloração azul em A e C indicam células vivas/ativas) sendo o pistilo essencialmente constituído pelos estigmas e estiletes (no seu maior estado de diferenciação onde é possível observar-se o tecido transmissivo). Os estiletes nesta fase tornam-se recurvados

(figura C) ficando as superfícies estigmáticas mais expostas. A flor é protegida por brácteas que constituem o perianto, de onde emergem os estiletos. Sob a flor começa a desenvolver-se a cúpula, ligada à flor pistilada na parte basal onde se irá desenvolver o ovário, sendo já possível distinguirem-se escamas e primórdios de escamas (junto à flor); **D-F** – No início desta fase os estigmas começam a senescer e o tecido transmissivo torna-se inativo (coloração avermelhada, figura D). Na base da flor, a cavidade do ovário começa a evoluir surgindo tricomas e primórdios dos septos que irão dividir o ovário. A ligação entre a flor e a cúpula torna-se mais evidente começando as escamas da cúpula a sobrepor-se aos tecidos florais para os proteger. Supõe-se que é na zona de fusão dos estiletos que os tubos polínicos ficam retidos, formando caloses, a aguardar o desenvolvimento dos óvulos; **G-I** – No final desta fase algumas células dos estigmas permanecem ativas no entanto a maioria das células que constituem o tecido transmissivo estão inativas. Durante a fase Gf o ovário praticamente não aumenta de volume mas já se distinguem os lóculos dos ovários divididos por septos nas paredes dos quais se começam a desenvolver os primórdios dos óvulos. A partir desta fase o complexo estigma estilete permanece praticamente inalterado registando-se sobretudo evolução a nível do ovário. A cúpula envolve agora de forma evidente aos tecidos florais. (B = bráctea; Cp = cúpula; CS = escama da cúpula; L = lóculo do ovário; OP = primórdio do óvulo; Ov = ovário; OvC = cavidade do ovário; OvSeP = primórdios dos septos dos ovários; P = perianto; PTA = retenção dos tubos polínicos; S = estilete; Se = septo do ovário; St = estigma; StS = superfície estigmática; Tr = tricomas; TT = tecido transmissivo. Coloração: A, C, D e G - astra blue e safranina O; B, E, F, H e I - hematoxilina de Heidenhain).

É só durante o estágio Gf que se começa a observar alguma organização do ovário com o crescimento dos septos e conseqüente formação dos lóculos e o aparecimento de primórdios de óvulos nas paredes dos septos. Nalguns casos, no final desta fase, já se conseguem distinguir óvulos mais desenvolvidos. O diâmetro do ovário contudo quase não aumenta durante esta fase. A cúpula começa a envolver os tecidos do ovário. Uma vez que os tecidos dos estigmas, que revestem o topo e as faces internas dos estiletos, no final desta fase perdem por completo a recetividade, assumindo uma coloração acastanhada, este complexo (estigma + estilete) passa a tornar-se residual tendo os tubos polínicos migrado e possivelmente ficado retidos no estilete perto do ovário (PTA na figura 8.F) enquanto aguardam pelo estímulo originado pela diferenciação dos óvulos. Os autores Boavida *et al.* (1999) referenciam, nesta espécie, a zona de fusão dos estiletos como o local onde os tubos polínicos ficam retidos formando tampões de calose e uma vez que não encontraram tecido transmissivo diferenciado puseram a hipótese de ser criada uma barreira anatómica nesta zona. Esta local também é apontada por outros autores (Liu *et al.*, 2014) em *Corylus heterophylla* Fisch, uma espécie da mesma ordem (*Fagales*) onde também se verifica um atraso entre a polinização e a fertilização, como uma zona de retenção dos tubos polínicos na fase progâmica, formando-se na base dos estiletos uma cavidade lenhificada.

Na fase Hf, a principal característica da evolução ontogénica, é o desenvolvimento dos óvulos com a máxima diferenciação dos tegumentos externos e internos e do nucelo onde, no decorrer desta fase, se verifica a megasporogénese (formação do megásporo) e a megagametogénese (desenvolvimento e maturação do saco embrionário). Nesta fase observa-se, no aspeto exterior, um aumento considerável do diâmetro ao nível do ovário. Nos cortes histológicos pode-se observar que este aumento está relacionado tanto com o desenvolvimento dos óvulos como com o desenvolvimento da parede do ovário (futuro pericarpo) e da cúpula que, nesta fase, caracteriza-se por envolver por completo os tecidos do ovário, protegendo estas estruturas. Este aumento foi na ordem dos dois/três milímetros (de um para cerca de três/quatro milímetros). Através da análise dos cortes histológicos pode-se então considerar que a maturação do saco embrionário ocorre quando na secção transversal resultante do plano que atravessa o ovário (ovário+cúpula) se registam diâmetros entre os três e os quatro milímetros. A fertilização deverá ocorrer logo após a maturação do saco embrionário, sendo um dos eventos fenológicos mais delicados (Corti, 1955; Carvalho *et al.*, 1999).

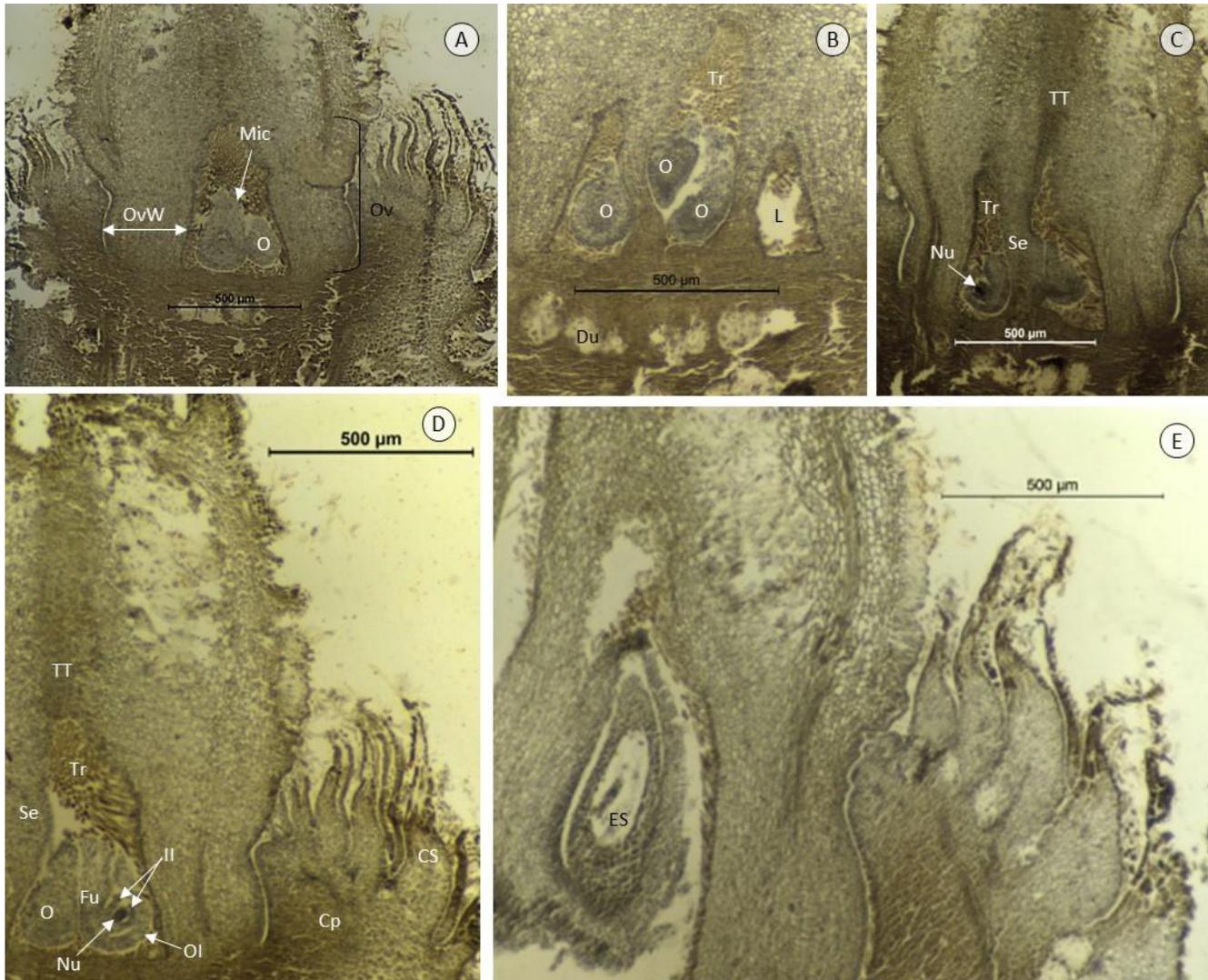


Figura 9: Secções longitudinais de cortes histológicos em flores femininas no estágio fenológico Hf. Nas figuras A, C, D encontram-se cortes duma flor colhida a 11/07/2013, na B duma flor colhida a 18/07/2013 e na E duma flor colhida a 06/08/2013, todas da árvore 3. **A** - Neste corte é possível observar-se um lóculo do ovário com dois óvulos. No óvulo da esquerda está assinalado um micrópilo ortotrópico (neste corte apenas formado pela primina) através do qual os núcleos germinativos e o reprodutivo (masculino) passarão para entrarem no saco embrionário. Está ainda assinalada a parede do ovário (futuro pericarpo do fruto) que se vai desenvolvendo acompanhando o desenvolvimento dos óvulos (contribuindo o conjunto destas estruturas para o aumento considerável de volume do ovário nesta fase); **B** - Ovário com os três lóculos que normalmente surgem nesta espécie. No lóculo central observam-se dois óvulos, número que habitualmente ocorre por lóculo. Dentro dos lóculos estão ainda identificados os tricomas que revestem o interior da cavidade e rodeiam os óvulos. Em baixo do ovário, na zona da cúpula, encontram-se drusas; **C** - Ovário com dois lóculos separados pelo septo. No óvulo do lóculo da esquerda consegue-se distinguir um nucelo em forte atividade mitótica (intensamente corado). Por cima do lóculo da direita conseguem-se distinguir o tecido transmissivo (por onde migra o tubo polínico) que se prolonga até ao lóculo; **D** - Neste corte consegue-se distinguir a cúpula escamosa que cobrirá por completo o ovário e o fruto numa fase inicial e um lóculo com dois óvulos. No óvulo da direita estão identificados o nucelo, os tegumentos internos ou secundina, os tegumentos externos ou primina e o funículo que faz a ligação entre as estruturas anteriores e a placenta no septo; **E** - Pormenor de um óvulo onde se consegue distinguir um saco embrionário próximo da maturação. (Cp = cúpula; CS = escamas da cúpula; Du = drusas; ES = saco embrionário; Fu = funículo; II = tegumento interno ou secundina; L = lóculo do ovário; Mic = micrópilo; Nu = nucelo; O = óvulo; Ol = tegumento externo ou primina; Ov = ovário; OvW = parede do ovário; Se = septo; Tr = tricomas; TT = tecido transmissivo. Coloração: hematoxilina de Heidenhain).

Na figura 10 encontram-se esquematizados alguns períodos característicos na fase progâmica com base em cortes histológicos a flores femininas da árvore 3, no ano 2013. A aderência dos grãos de pólen aos estigmas marca o início da fase progâmica na flor pistilada que terá ocorrido em meados de maio. Depois de reidratados os grãos de pólen germinam (figura 11.A) e inicia-se o crescimento dos tubos polínicos em direção aos óvulos. O crescimento inicial dos tubos polínicos é relativamente rápido tendo-se registado a sua presença próximo da região de fusão dos estigmas 16 dias após a polinização (figura 11.B). Contudo, este crescimento terá eventualmente abrandado ou mesmo cessado durante algum tempo uma vez que, por esta altura, não existem ainda óvulos diferenciados, apenas um ovário no início da diferenciação onde se observa o crescimento dos septos que vão dividir o ovário em 3 lóculos. Passados cerca de 15 a 20 dias (30 a 35 dias após polinização) colheram-se as primeiras flores femininas onde se conseguem distinguir primórdios de óvulos. A diferenciação evidente dos óvulos em tegumentos externos e internos e nucelo (figura 11.C) foi identificada em cortes histológicos de flores colhidas cerca de 55 dias após a polinização. Todavia foi só aos 83 dias após a polinização que se conseguiu distinguir, num corte histológico de um óvulo, um saco embrionário próximo da maturação (figura 11.D). A fecundação ocorrerá apenas depois desta data o que sugere que nesta árvore, no ano 2013, terá ocorrido em meados do mês de agosto (12/13 semanas após a polinização). Este período aqui indicado é muito superior ao reportado num estudo anterior sobre a reprodução sexuada do sobreiro com ênfase na fase progâmica (Boavida *et al.* 1999), onde é indicado um intervalo de cerca de seis semanas entre a polinização e a fertilização. Para além do trabalho desenvolvido por Boavida *et al.* (1999), a duração da fase progâmica em ciclos de maturação anual nesta espécie foi ainda pouco estudada em detalhe, indicando alguns autores períodos entre 1 a 2 meses (Elena-Rossello *et al.*, 1993; Feijó *et al.*, 1999), e outros períodos desde a polinização à fertilização de mais de 2 meses podendo, nalguns casos, chegar a 3 meses (Corti, 1955).

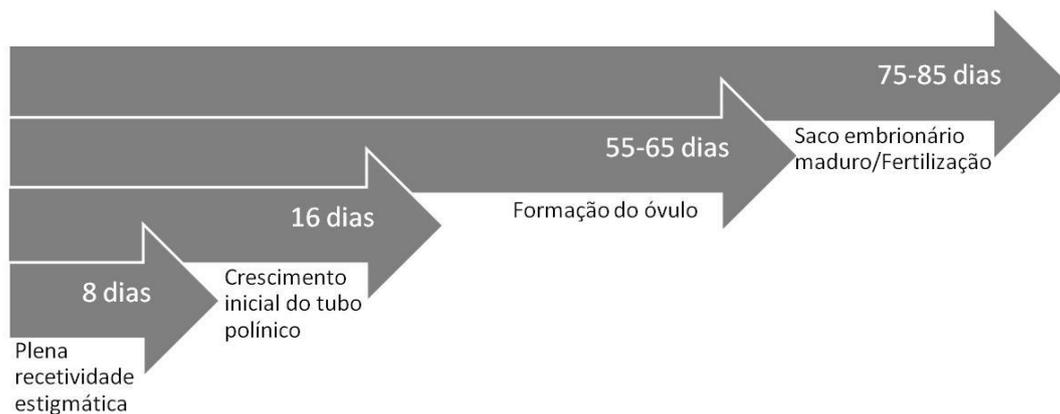


Figura 10: Esquema ilustrativo dos períodos de alguns dos eventos mais relevantes no processo reprodutivo do sobreiro. Estão esquematizados os intervalos entre o início da recetividade estigmática (altura a partir da qual é possível ocorrer a polinização) e o final da plena recetividade estigmática, o desenvolvimento inicial dos tubos polínicos, a diferenciação dos óvulos (nucelo, secundina e primina) e o aparecimento de sacos embrionários maduros, altura a partir da qual poderá ocorrer a singamia, com base em observações de cortes histológicos de material colhido na árvore 3 durante o ano 2013.

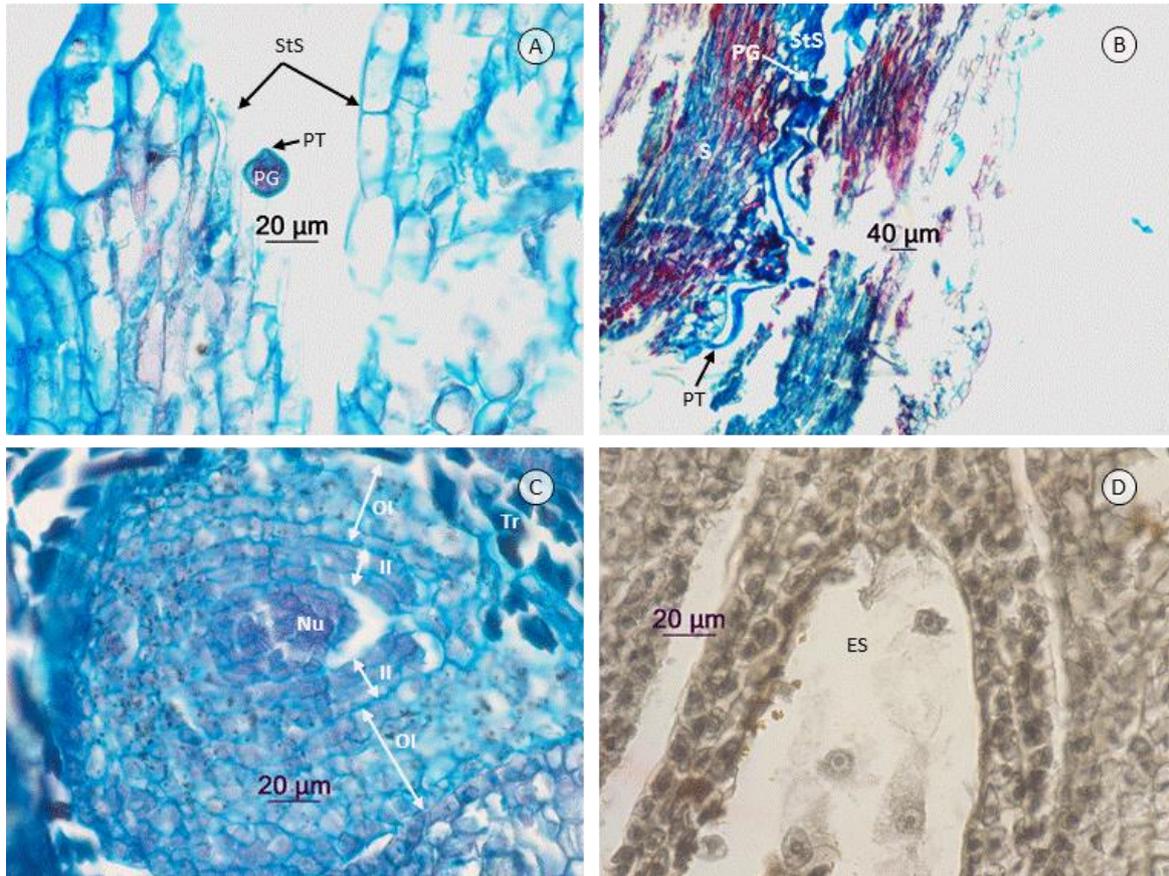


Figura 11: Cortes longitudinais de flores femininas representativos de algumas das fases mais relevantes da evolução gametófito masculino e da formação do gametófito feminino durante a fase progâmica. **A** - Pormenor de um grão de pólen a germinar (tubo polínico) sobre a superfície estigmática de uma flor pistilada colhida a 23/05/2013 na árvore 3; **B** - Evolução de tubos polínicos na região do estigma e estilete numa flor feminina colhida a 31/05/2013 na árvore 3. Está também identificado um grão de pólen vazio e ainda aderente à superfície estigmática; **C** - Óvulo em diferenciação, rodeado por tricomas que revestem o interior do lóculo do ovário, onde já se conseguem distinguir os tegumentos internos ou secundina, os tegumentos externos ou primina e o nucelo. Flor colhida a 18/07/2013 na árvore 3; **D** - Pólo micropilar de um saco embrionário em maturação numa flor colhida a 06/08/2013. (ES = saco embrionário; II = tegumento interno ou secundina; OI = tegumento externo ou primina; Nu = nucelo; PG = grão de pólen; PT = tubo polínico; S = estilete; StS = superfície estigmática; Tr = tricomas. Coloração: A-C - astra blue e safranina O; D - hematoxilina de Heidenhain).

A decisão entre o momento em que se pode considerar a estrutura floral como fruto é controversa, sendo necessários cortes histológicos sistemáticos para se fazer corresponder uma determinada fase macroscópica a uma fase do desenvolvimento embrionário (Sá, 1995). A singamia marca assim o final da fase progâmica e passa-se a considerar o desenvolvimento do fruto com a formação de um zigoto, seguido do desenvolvimento embrionário. Nesta altura também ocorre a formação do núcleo primário do endosperma (triploide) após a fusão de um dos dois núcleos germinativos do tubo polínico com os dois núcleos polares do mesocisto, originando mais tarde o endosperma, um tecido nutritivo que sustentará o desenvolvimento embrionário. À formação do zigoto e do núcleo primário do endosperma dá-se o nome de dupla fecundação.

A fenologia do fruto é documentada na figura 12 onde são estabelecidos 5 estádios fenológicos diferentes desde que o fruto se encontra totalmente envolvido pela cúpula até à sua maturação quando o fruto apresenta cor castanha. A ontogenia de cada um dos estádios considerados é registada nas figuras 13 e 15. Em seguida, fazem-se algumas observações comparando estas duas perspetivas.

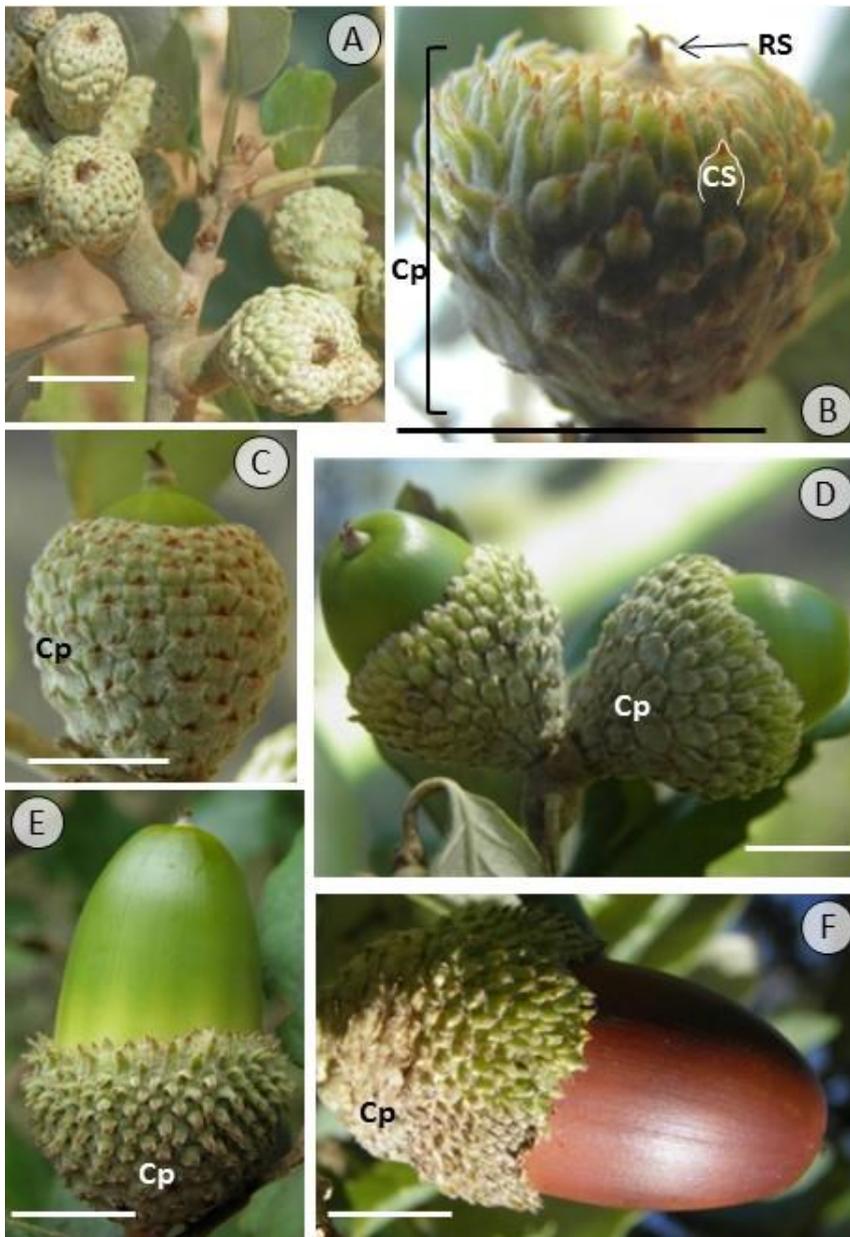


Figura 12: Evolução fenológica do fruto do ano na parcela estudada na Quinta da Serra em 2013. **A** - Bolota no início do desenvolvimento do estágio 1 no princípio de setembro; **B** - Bolota no estágio 1 que começou em finais de agosto e prolongou-se até inícios de outubro. A cúpula de escamas envolve por completo o fruto sendo visíveis os estiletes residuais. A parte mais distal da cúpula, começa por apresentar formas mais arredondadas (figura A) acabando por achatarse neste local de onde o fruto irá emergir assumindo uma forma mais cônica (figura B); **C** - Fruto no estágio 2, onde se pode observar o fruto a emergir da cúpula. Este estágio registou-se em finais de setembro e início de outubro; **D** - Estádio fenológico 3, quando o fruto emerge notoriamente da cúpula, tendo sido observados essencialmente entre o início de outubro e meados de outubro; **E** - Fruto do ano no estágio 4 de dimensão praticamente definitiva ainda com coloração verde. Este estágio foi sobretudo observado entre meados de outubro e meados de novembro; **F** - Fruto do ano no estágio 5, já maduro, observado a partir de novembro. (Cp = cúpula; CS = escama da cúpula; RS = estilete residual. Escala das barras: 1 cm).

Entre meados de agosto (altura em que terá ocorrido a singamia na árvore 3) e meados de setembro o fruto passa por um rápido desenvolvimento passando de dimensões de menos de meio centímetro para cerca de um centímetro considerando o diâmetro ao nível do plano do ovário (figura 13.A). É durante este período que o embrião passa por todas as fases características do desenvolvimento do proembrião. Embora não tivessem sido encontrados cortes que documentassem a embriogénese, pode-se observar que nos cortes dos frutos, no estágio 1 (figura 13), de dia 19/09/2013 o embrião já se encontra em fase de desenvolvimento cotiledonar. Este conjunto de cortes pertence a dois frutos no mesmo estágio colhidos no mesmo dia. No entanto, é possível observar-se uma diferença no desenvolvimento dos embriões dos dois frutos desta figura encontrando-se o embrião do fruto da figura 13.C um pouco mais atrasado relativamente ao embrião do fruto da figura

13.D. Este ligeiro desfasamento na evolução ontogenética dos frutos no estágio 1 revela que é durante este estágio que o embrião forma todas as estruturas essenciais na germinação do fruto encontrando-

se, por exemplo, o eixo embrionário já com as zonas dos meristemas apicais caulinares e radiculares definidas no embrião mais evoluído (figura 13.D). Do estágio 1 para o 2, quando o fruto surge pela primeira vez fora da proteção da cúpula, aparecendo a ponta verde do fruto na zona distal, junto aos estigmas residuais (figura 12.c), observa-se, a nível ontogénico (figura 15.A e B), um grande desenvolvimento dos diferentes órgãos do embrião, sendo agora evidente um eixo embrionário com quase o triplo do comprimento registado no corte histológico do estágio anterior (figura 13.D). Nesta altura tornam-se distinguíveis os primórdios das folhas cotiledonares. Os cotilédones nesta fase representam a maioria do volume do embrião, envolvendo nitidamente os restantes tecidos do embrião. Do estágio 2 para o estágio 3, definido pela notória emergência do fruto a partir da cúpula (figura 12.D), observa-se novo aumento do tamanho do embrião tanto a nível do eixo embrionário como a nível dos cotilédones. A partir do estágio 3 o eixo embrionário praticamente não sofre alterações (figuras 15.D,F,G) atingindo comprimentos na ordem dos 3 milímetros (entre a extremidade da coifa e o meristema caulinar, sendo os cotilédones os responsáveis pelo aumento de volume verificado na maioria dos frutos entre os estádios 3 e 5 (figuras 12.D-F). Destas observações pode-se então concluir, relativamente à evolução e desenvolvimento embrionário, que antes do fruto emergir da cúpula (que na árvore 3 ocorreu no início do mês de outubro) já se formaram todos os órgãos do embrião e que a partir da fase fenológica 3 (que ocorreu entre meados e finais de outubro na árvore 3) ocorre essencialmente desenvolvimento dos cotilédones, o que sugere que a partir desta fase apenas se desenvolvem os tecidos de reserva essenciais no processo natural de germinação. Já em 1997, Reforço afirmava que o desejável seria que a cada fase macroscópica se conseguisse associar uma dada fase do desenvolvimento embrionário.

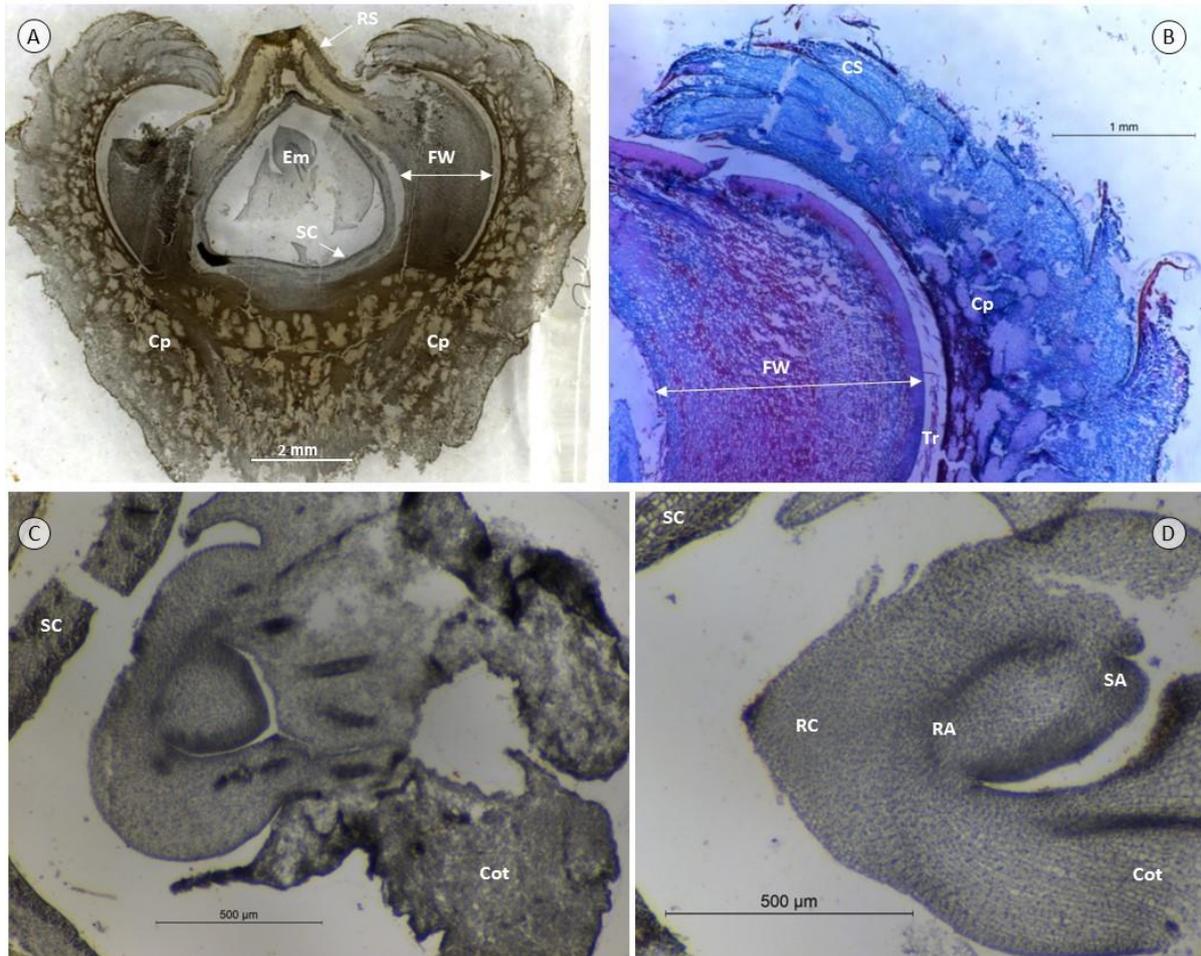


Figura 13: Ontogenia de frutos no estágio 1 colhidos a 19/09/2013 na árvore 3, em secções longitudinais. **A** - Fruto onde é possível distinguir-se a cúpula a envolver o fruto quase na sua totalidade, exceto nos estiletes residuais, o pericarpo, o tegumento e o embrião do fruto; **B** - Pormenor da cúpula revestida de escamas e do pericarpo que rodeiam e protegem o embrião; **C** - Pormenor de um embrião, onde se conseguem distinguir primórdios cotiledonares, envolvido pelo tegumento; **D** - Pormenor de um embrião onde já se conseguem distinguir os meristemas apicais caulinar e radicular, o primórdio da coifa e cotilédone. (Cot = cotilédone; Cp = cúpula; CS = escama da cúpula; Em = embrião; FW – pericarpo; RA = meristema apical radicular; RC = coifa; RS = estilete residual; SA = meristema apical caulinar; SC = tegumento que reveste o embrião. Coloração: B - astra blue e safranina O; A,C,D - hematoxilina de Heidenhain).

Através destas observações e numa perspetiva futura de acelerar o processo de obtenção de embriões resultantes de polinizações *in vitro*, levanta-se a hipótese de se usar embriões logo após a formação de todos os seus órgãos ou até mesmo antes, em fases mais iniciais do desenvolvimento embrionário, a partir da altura em que os meristemas caulinares e radiculares se diferenciam, com o recurso a meios nutritivos e condições controladas. Assim, os embriões dos frutos a partir da fase final do estágio fenológico 1 (figura 14), depois um período de cerca de 45 dias após fecundação (06/08/2013 a 19/09/2013), já poderiam ser utilizados, evitando-se os períodos subsequentes de maturação do fruto que podem durar até mais de 3 meses. Na generalidade da parcela em estudo e na árvore 3, durante o ano 2013, a maturação (estádio 5) ocorreu entre finais de outubro e inícios de dezembro. Neste tópico da germinação precoce, Prewein *et al.* (2006) observaram que os embriões zigóticos de *Quercus robur* L. adquirem capacidade germinativa muito cedo no seu desenvolvimento, durante a fase globular e obtiveram taxas relevantes de germinação a meio da fase de coração (fase

exponencial do crescimento) e no início da fase cotiledonar, tendo deixado depois de observar germinações precoces, em meio sem reguladores de crescimento. A germinação precoce diminuiu significativamente quando a fase de expansão dos órgãos deu lugar à fase de maturação (depois de todos os órgãos diferenciados). Neste estudo estabeleceram ainda relações entre as concentrações endógenas de hormonas vegetais e a capacidade germinativa.

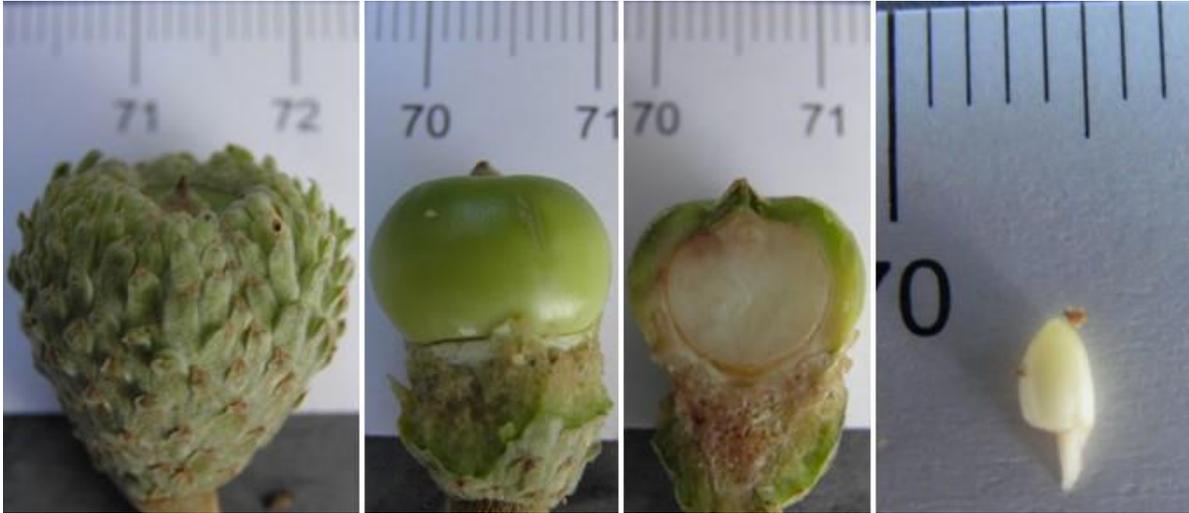


Figura 14: Fruto no estágio 1 em 19/10/2013. Sequência da esquerda para a direita: aspeto exterior do fruto, fruto sem cúpula, secção longitudinal do fruto, embrião estruturalmente maduro.

Relativamente ao pericarpo do fruto, entre o estágio 1 (figura 13.B) e o estágio 2 (figura 15.C) observou-se a sua diferenciação nas diferentes camadas de tecidos que o constituem. Entre o estágio 2 e o estágio 3 (figura 15.E) o pericarpo não sofre mudanças relevantes à exceção talvez de uma maior percentagem de células mortas (coradas de rosa).

Pode encontrar-se no anexo III um quadro que resume as principais relações entre a morfologia externa e a anatomia nas fases de desenvolvimento fenológico das flores e frutos acima consideradas.

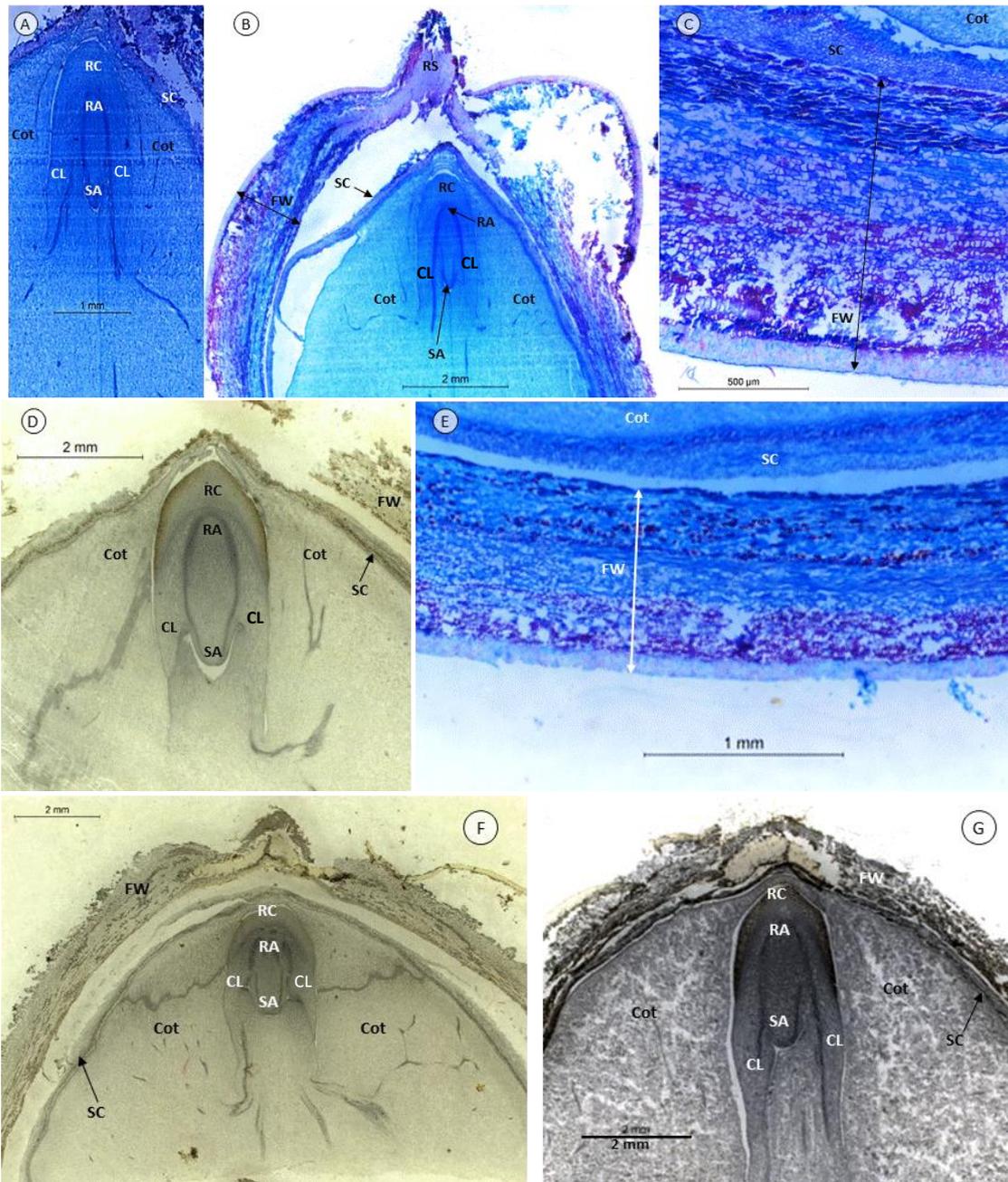


Figura 15: Ontogenia de frutos entre os estádios fenológicos 2 e 5. **A-C** - Cortes histológicos longitudinais num fruto no estágio 2 colhido a 09/10/2013 na árvore 3; **A** - Pormenor de um embrião onde se conseguem distinguir no eixo embrionário os meristemas apicais caulinar e radicular, a coifa, os cotilédones, os primórdios de folhas cotiledonares e o tegumento de proteção; **B** - Aspeto geral de um embrião constituído por dois cotilédones, dois primórdios de folhas cotiledonares, a coifa e pelo eixo embrionário (onde se encontram os meristemas apicais caulinar e radicular) e envolvido pelo pericarpo encimado pelo estilete residual; **C** - Estrutura de proteção do embrião (pericarpo e tegumento) num fruto no estágio 2; **D-E** - Cortes histológicos longitudinais dum fruto em 3 colhido a 23/10/2013 na árvore 3; **D** - Anatomia do fruto onde sem consegue identificar o pericarpo, o tegumento os cotilédones, os primórdios de folhas cotiledonares, a coifa e os meristemas apicais radicular e caulinar; **E** - Pormenor da estrutura de proteção do embrião (pericarpo e tegumento) num fruto no estágio 3; **F** - Anatomia dum fruto (secção longitudinal) no estágio de desenvolvimento 4 colhido a 23/10/2013 na árvore 3 onde é possível observar-se o mesmo tipo de estruturas já identificadas nas figuras relativas aos cortes histológicos de frutos nos estádios 2 e 3; **G** - Anatomia dum fruto (secção longitudinal) no estágio 5 colhido a 26/11/2013 na árvore 3 onde se identificam as mesmas estruturas observadas em frutos nos estádios anteriores. (Cot = cotilédones; CL = primórdio de folhas cotiledonares; FW = pericarpo; RA = meristema apical radicular; RC = coifa; RS = estilete residual; SA = meristema apical caulinar; SC = tegumento que reveste o embrião. Coloração: A-C e E - astra blue e safranina O; D, F e G - hematoxilina de Heidenhain).

Durante o acompanhamento do desenvolvimento fenológico das flores femininas na parcela estudada registou-se uma assincronia entre árvores e dentro da mesma árvore (relacionada sobretudo com a dessincronização dos abrolhamentos das flores de primavera). Esta assincronia acentuou-se no desenvolvimento dos frutos, tendo sido registados até três estádios de desenvolvimento do fruto coincidentes, nalgumas árvores. Este comportamento poderá estar relacionado com fatores fisiológicos na árvore, com fatores biológicos e/ou fitossanitários ou até com fatores (micro)climáticos.

Neste ano em que se acompanhou a fenologia do sobreiro na Quinta da Serra, no âmbito deste trabalho, registou-se também a maturação de frutos polinizados na primavera do ciclo anterior (ciclo bienal), a que normalmente se dá o nome de bastão, numa percentagem considerável das árvores em estudo (mais de 50%, mas destas apenas 35% apresentaram bastão em quantidades relevantes), incluindo a árvore 3. A maturação destes frutos ocorreu mais cedo (outubro) que a dos frutos de ciclo anual (entre finais de outubro e dezembro) tendo sido utilizada a mesma escala fenológica na caracterização da evolução da fenologia dos frutos de ciclo bienal e dos frutos de ciclo anual. Este tipo de frutificação bienal deve ser tida em conta quando se fazem polinizações controladas pois podem ocorrer maturações bienais em vez de anuais, o que aumentaria em larga escala o tempo necessário para obtenção de embriões. Neste tipo de frutificações bienais, a flor feminina no estágio Hf ou fruto no estágio 1 entra em repouso vegetativo no início do inverno, sendo o crescimento retomado na primavera do ciclo seguinte (Vinagre *et al.*, 2005). A produção de bastão é uma característica de determinadas proveniências e dentro das populações é uma característica individual de variação anual, podendo nalguns anos atingir níveis significativos nalguns indivíduos (Vinagre *et al.*, 2005). Ellena-Rossello *et al.* (1993) associaram este tipo de biótipo bienal, a climas onde se registam secas estivais longas, invernos rigorosos e longos e com ocorrência de geadas tardias na primavera em regiões marginais na distribuição da espécie. Desta forma a época mais favorável de floração é no final da primavera e início do verão diminuindo as probabilidades de geadas tardias. Uma vez que os verões são bastante secos o desenvolvimento da flor é interrompido de modo a que a fertilização e o desenvolvimento inicial do fruto ocorram no ano seguinte após o final da época desfavorável. Estas diferentes estratégias de reprodução, segundo os mesmos autores, parecem sobretudo relacionar-se com a plasticidade fisiológica da espécie que permite a adaptação a condições climáticas variáveis e imprevisíveis, características de climas mediterrâneos. Assim o biótipo anual encontra-se sobretudo em climas mediterrâneos mais húmidos e com menos contraste entre estações e o biótipo bienal em climas mediterrâneos com condições climáticas mais rigorosas em ambientes onde os biótipos anuais não se conseguem adaptar. Esta perspetiva já havia sido defendida por Corti em 1955. Este último autor considera ainda que a coexistência dos dois biótipos, em determinado ambiente, se deve aos fenómenos de hibridação ou no máximo à possibilidade de existência de algum caractere na condição de coordenação com o caractere principal. Em estudos mais recentes (Díaz-Fernández *et al.*, 2004; Pons e Pausas, 2012) tem-se vindo a dar uma importância cada vez maior às condições climáticas como fatores com relevante influência tanto sobre o tipo de maturação (anual ou bienal) como sobre o volume de produção.

3. Aspetos a ter em consideração para a colheita de material vegetal para instalação *in vitro*

Um dos objetivos deste trabalho foi conhecer a disponibilidade de estruturas reprodutivas para instalação *in vitro*. O sobreiro é uma espécie que apresenta um comportamento reprodutivo muito irregular (Natividade, 1950; Corti, 1955), com irregularidades na abundância de floração que é variável de ano para ano, num indivíduo, conseguindo apenas participar, em cada ano, um número reduzido de árvores no processo reprodutivo devido, em parte, à escassez de floração (Varela, 1994; Carvalho *et al.*, 1999). Para além disto a evolução da floração tanto na data de iniciação como na duração de cada estágio fenológico, pode variar conforme as condições meteorológicas (Carvalho *et al.*, 1999; Díaz-Fernández *et al.*, 2004; Patrício, 2004; Gómez-Casero *et al.*, 2007). Assim, para a determinação do início da principal época de floração, na primavera, (período com maior interesse para recolha de flores femininas devido à regularidade do seu aparecimento, por vezes com alguma abundância) é preciso ter um maior conhecimento do historial fenológico da parcela e do comportamento fisiológico da espécie em resposta às variantes climáticas.

Para quantificar a abundância de floração e produção de fruto, podem estabelecer-se graus de floração masculina e frutificação para cada indivíduo (Varela, 1994). Através destes dados pode-se conhecer, ao longo dos anos, as árvores que apresentam os melhores padrões de produção, tanto de floração como de frutificação. No caso da Quinta da Serra, esse trabalho já foi realizado (Moreira, 2005), tendo-se registado apenas 4 safras abundantes em 11 anos. Os graus de floração e frutificação podem, desta forma, ajudar na escolha dos indivíduos para recolha de material vegetal, conforme a abundância de floração e/ou frutificação, podendo assim otimizar-se o processo de recolha, aumentando hipoteticamente a disponibilidade de flores femininas para instalação *in vitro*. Como visto anteriormente, os períodos de floração esporádica fora da primavera podem ser ainda uma fonte adicional, embora imprevisível no aparecimento e em menor abundância (Corti, 1955; Varela, 1994; Boavida *et al.*, 1999), de flores femininas.

A disponibilidade de flores femininas é desta forma, na maioria dos anos, escassa, sendo por isso difícil reunir-se uma quantidade apreciável de flores femininas para se proceder a instalações *in vitro*, apenas colhendo um reduzido número de segmentos de ramos da copa na altura adequada. Alguns fatores poderão contudo otimizar a recolha deste material na copa. Sabe-se por exemplo que as faces das copas das árvores voltadas a sul, com maior exposição à luz solar e sem ensombramento, florescem primeiro (Gómez-Casero *et al.*, 2007), ocorrendo as inflorescências femininas em maior número também nestas zonas da copa (Carvalho *et al.*, 1999).

Como o sobreiro é uma espécie protândrica e anemófila, quando as flores femininas surgem na primavera é provável que já exista pólen disponível na atmosfera. Assim as flores femininas devem colher-se numa altura em que os estigmas ainda não emergiram das escamas imbricadas entre os estádios fenológicos Df (gomos axilares reprodutivos com escamas verdes) e Ef (alongamento do eixo da espiga com emergência do primeiro par de flores). Pelas observações feitas em campo durante o ano em estudo, estes estádios costumam ocorrer em rebentos em orelha-de-rato, numa fase inicial do alongamento do eixo do rebento, quando as folhas apresentam uma inclinação a partir de 45° (figura 16). O estádio Df é preferível ao Ef porque, neste último, poderão já ter começado a emergir os



Figura 16: Aspectos de rebentos no estádio fenológico orelha-de-rato, onde se poderão encontrar as estruturas reprodutivas femininas indicadas (entre Df e Ef) para uma instalação sem estigmas contaminados com pólen. (Escala das barras: 1cm).

estigmas, podendo por isso ser contaminados com pólen. Contudo, no estádio Df ainda não existem diferenças macroscópicas relevantes entre os gomos reprodutivos e os restantes gomos do rebento, não se conseguindo distinguir os gomos reprodutivos dos rebentos em orelha-de-rato, sendo por isso prudente a instalação de todos os gomos axilares dos novos rebentos. Contudo, a bibliografia aponta para a maior incidência destas inflorescências nas axilas da parte média à extremidade do lançamento (Pereira Coutinho, 1936; Natividade, 1950; Sá, 1995).

3.1. Diferenciação de gomos

Durante a realização deste trabalho também se colheram, na árvore 3, gomos axilares, dos últimos crescimentos, durante todo o ciclo, na tentativa de se encontrarem estruturas reprodutivas diferenciadas nos meristemas dos gomos, para definir com maior precisão as épocas do ano em que se poderiam colher ramos para a cultura *in vitro*. Os resultados destas observações poderão permitir uma maior segurança de que nesses ramos poderiam eventualmente encontrar-se gomos axilares com estruturas reprodutivas diferenciadas que abrochariam depois sobre condições controladas *in vitro* ou em laboratório, havendo a certeza de que as flores obtidas desta forma não teriam sido contaminadas com pólen. Em material mais suberizado, resultante de crescimentos menos recentes, haveria ainda a hipótese de se proceder a desinfecções superficiais mais agressivas e tratamentos prévios sem se danificar o material de interesse. Sobre a diferenciação de primórdios florais, Feijó *et al.* (1999) consideraram que esta ocorre apenas alguns meses após a floração primaveril, apresentando-se essas estruturas maduras antes do início da dormência, em outubro. No âmbito deste trabalho as estruturas com maior interesse são as femininas, no entanto apenas foram encontrados gomos vegetativos, masculinos e mistos (masculinos e vegetativos) (figura 17), no final de outubro, na árvore 3, durante o período em que se fez o acompanhamento histológico desta árvore o que é um indício de que a diferenciação das flores masculinas se inicia no ano precedente ao da floração. Este mês, no ano 2013, foi marcado por um volume de precipitação muito superior ao habitual nesta zona e com um aumento da temperatura média mensal em mais de 1°C, relativamente ao normal. Nesta mesma parcela, Reforço (1997) encontrou, em dezembro, estruturas reprodutivas induzidas em cortes histológicos de gomos

axilares. Apenas uma pequena percentagem dos gomos que analisou, nessa altura, apresentava amentilhos diferenciados. Em fevereiro, encontrou todas as estruturas masculinas diferenciadas distinguindo anteras bem desenvolvidas. No conjunto das árvores acompanhadas (31 árvores adultas) no ano 2013 foram encontradas flores femininas recetivas em apenas 4 árvores em meados/finais de agosto o que indica que no início de agosto de 2013 já haveriam gomos com flores femininas diferenciadas. Conhecer os fatores que levam aos episódios atípicos de floração juntamente com o conhecimento das árvores que têm a capacidade de apresentar estes tipos de florações fora da época regular podem ser um contributo para aumentar a probabilidade de se colher ramos com flores diferenciadas.

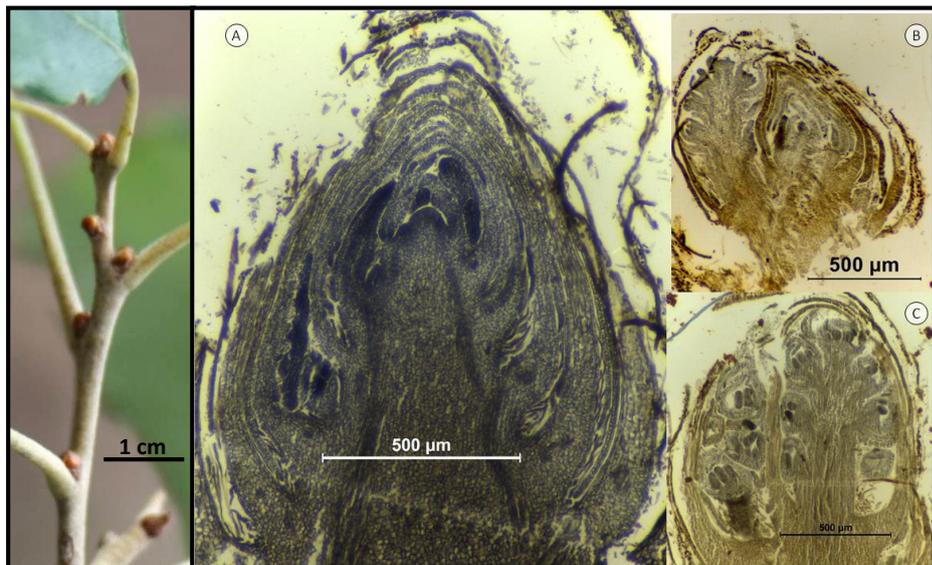


Figura 17: Esquerda – aspeto exterior de gomos axilares. Direita - Cortes histológicos longitudinais de um gomo vegetativo (A), um gomo misto (masculino e vegetativo - B) e um gomo masculino (C). Os gomos misto e masculino foram colhidos a 23/10/2013 e o gomo vegetativo a 30/10/2013 na árvore 3 (coloração: Hematoxilina de Heidenhain).

3.2. Recetividade dos estigmas *in vivo* vs. *in vitro*

Os estigmas no seu ambiente natural, segundo a bibliografia (Boavida *et al.*, 1999; Feijó *et al.*, 1999), mantêm-se recetivos durante cerca de 5-7 dias. Contudo nas experiências *in vitro* com flores femininas verificou-se um ligeiro aumento (em cerca de 2-4 dias) deste período de recetividade estigmática o que se deverá, muito provavelmente, às condições homogéneas de temperatura e humidade em que se mantêm as culturas, ausência de fatores climáticos como o vento e ausência de alguns agentes bióticos, entre outros fatores que no meio natural são responsáveis pela perda de recetividade estigmática.

4. Protocolos de histologia

No que diz respeito aos protocolos histológicos utilizados o que se mostrou mais eficiente para as peças de maiores dimensões e de tecidos de diferentes densidades foi o protocolo 1. Nos outros dois protocolos este tipo de peças por vezes apresentava deficientes inclusões ou a nível dos tecidos mais interiores ou dos mais exteriores mas mais densos como os pericarpos dos frutos. Estes factos podem-se relacionar sobretudo com a duração da inclusão uma vez que se mantiveram durante mais tempo algumas peças em parafina líquida e os resultados foram semelhantes aos do protocolo 1. As peças de menores dimensões tiveram resultados aceitáveis em qualquer um dos protocolos utilizados.

Ainda relativamente às peças de maiores dimensões e com tecidos de diferentes densidades, como os frutos, em algumas das peças a fixação foi insatisfatória em qualquer um dos protocolos utilizados. Este facto pode ser explicado pela necrose dos tecidos já antes da fixação ou pela incapacidade do fixador chegar aos tecidos mais internos (especialmente nalguns frutos em que não se procedeu à preparação antes da fixação descrita nos materiais e métodos). Assim, pelo menos neste último caso, a utilização de vácuo durante o processo de fixação poderá ser vantajosa.

IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Os principais resultados e contributos deste trabalho para o aumento de conhecimento sobre o estabelecimento *in vitro* de material vegetal colhido diretamente do campo, a fenologia e a biologia reprodutiva do sobreiro, visando a possibilidade de realização de fertilizações *in vitro* no âmbito de programas de melhoramento menos dependentes das condições de campo, encontram-se a seguir enunciados.

Relativamente ao estabelecimento *in vitro*, conclui-se que a instalação de material adulto colhido diretamente do campo apresenta grandes dificuldades, quer pela baixa reatividade dos explantes quer pelas contaminações que estes trazem do campo, muito difíceis de eliminar. Os principais microrganismos responsáveis pelas contaminações na cultura *in vitro*, foram os fungos mas também surgiram alguns explantes colonizados por bactérias. Os processos de desinfeção mais eficientes foram os HCa2, HCa3, HCa5, FunCarb e os Fun² (com hipoclorito de cálcio e fungicidas), sendo as contaminações melhor controladas a médio longo prazo, em meios de água de agar sem açúcar ou com este composto em concentrações muito reduzidas.

Pode considerar-se um efeito de sazonalidade, com os gomos instalados *in vitro* mais reativos e com maior controlo das contaminações e menos fenómenos de oxidação e exsudação de fenóis a serem colhidos na altura de maior atividade das árvores, nos meses de primavera. Os gomos dos explantes de material obtido em condições controladas no laboratório também revelaram alguma reatividade.

Os estádios fenológicos dos rebentos que deram origem aos explantes com os melhores resultados *in vitro* coincidem com os estádios definidos como a melhor fase de colheita de material vegetal com estruturas sexuais femininas já diferenciadas, em estádios ainda incipientes, sem estigmas visíveis e/ou recetivos, para evitar contaminações destes com pólen.

O trabalho realizado aponta para que, sem técnicas de esterilização adequadas do material colhido diretamente do campo, torna-se muito difícil a instalação de tecidos *in vitro*. Tendo estes obstáculos em mente, um grande número de flores femininas teria que ser colhido para se ter sucesso na iniciação de uma cultura estéril e reativa de flores e/ou inflorescências femininas. Os métodos esporádicos aqui experimentados revelaram-se ineficazes para a instalação de flores femininas *in vitro*, devido sobretudo à dificuldade de se instalar culturas asséticas diretamente de material de campo e à reduzida percentagem relativa de estruturas femininas diferenciadas em relação aos gomos vegetativos.

Como seria de esperar, o desenvolvimento fenológico ao nível da parcela foi, de forma geral, mais dilatado do que quando apenas se considera um indivíduo, registando-se desta forma uma variabilidade intraespecífica.

No ano em estudo ocorreram surtos de crescimento vegetativo para além da época regular na primavera, tanto no verão como no início do outono, acompanhados por episódios atípicos de floração, feminina e masculina, respetivamente. Estes acontecimentos irregulares de floração podem, eventualmente, representar uma mais-valia para a instalação de flores femininas *in vitro*.

Os resultados obtidos através do estudo da ontogenia foram realizados apenas num indivíduo durante um ciclo reprodutivo anual, não devendo ser interpretados como sendo o padrão da espécie ou mesmo da parcela. Assim, será necessário um estudo mais abrangente tanto em número de

indivíduos como em número de anos, para se poderem tirar conclusões mais definitivas sobre os processos ontogenéticos nas estruturas reprodutivas do sobreiro. De todos os aspetos anatómicos estudados, ressalta um aspeto; o facto de termos concluído que o tempo que medeia entre a polinização e fecundação é mais extenso - ± 80 dias - do que alguns autores referem - ± 45 dias - (Boavida *et al.*, 1999), estando no entanto mais de acordo com alguns resultados apresentados por Corti em 1955, que admite um período progâmico que pode atingir os 3 meses. Salienta-se no entanto que, embora o nosso resultado seja relativo ao estudo efetuado numa só árvore, com os parâmetros de comparação que estabelecemos para a correspondência entre a fenologia e a ontogenia, podemos extrapolar no sentido deste modelo ser idêntico no resto da parcela, pelo menos durante o ano em que foram realizados os registos fenológicos.

O estabelecimento mais preciso da duração da fase progâmica, nas flores com maturação num ciclo reprodutivo anual, requer mais investigação pois fatores como o genótipo ou fatores abióticos podem influenciar a duração desta fase.

O objetivo proposto de estabelecer uma correspondência concreta entre a morfologia (fenologia) e a anatomia (ontogenia) foi atingido, permitindo que a uma observação fenológica corresponda uma determinada caracterização anatómica das estruturas internas.

Através da análise sequencial dos cortes histológicos a frutos ao longo do seu ciclo evolutivo, foi possível constatar que estes atingem o maior nível de diferenciação das estruturas internas do embrião numa fase muito precoce do seu desenvolvimento (estádio fenológico 1), cerca de 45 dias após fecundação, abrindo a hipótese destes poderem ser utilizados mais cedo para instalação *in vitro* (que poderão ter resultado de cruzamentos artificiais).

Das observações fenológicas realizadas na parcela conclui-se ainda que os segmentos de ramos a colher devem apresentar rebentos no estágio de orelha-de-rato, numa fase inicial do alongamento do eixo do rebento, onde se poderão encontrar inflorescências femininas em que os estigmas ainda não emergiram, ou seja, em estádios fenológicos anteriores à receptividade (Df e Ef). Para a instalação *in vitro*, salienta-se um aspeto que, embora não tenha sido quantificado neste trabalho foi notório, o número de ramos a colher tem de ser muito elevado, uma vez que nem todos os ramos produzem inflorescências femininas, existindo ainda variabilidade na produção de flores (por vezes escassa) entre indivíduos e ao longo dos anos. Acresce a esta problemática o facto de haver um grande número de flores que sofrem abscisão precoce, assim como de frutos que podem não completar a sua maturação.

1. Perspetivas futuras

Seguindo esta linha de trabalho, uma via que poderia ser melhor explorada é a instalação de material colhido entre meados de maio e início de junho, durante o grande surto de primavera (no estágio de orelha-de-rato, no início do alongamento do eixo do rebento, até à fase inicial da expansão foliar, quando o eixo está muito próximo do seu comprimento máximo), pois este material mostrou indícios de ser o mais reativo, para além de haver menos pressão de inóculo/contaminações e esta ser a época preferencial de floração do sobreiro. O processo de desinfeção superficial prévio à instalação, deve ser o mais curto possível para evitar exposições excessivas aos agentes de desinfeção que comprometam o explante, utilizando-se o hipoclorito de cálcio e fungicidas. Os explantes (com folhas) devem ser instalados em água de agar, procedendo-se a aplicações periódicas de fertilizantes foliares. A água de

agar poderá ser enriquecida com baixas percentagens de sacarose. Poder-se-á ainda experimentar suplementar a água de agar com BAP (para estimular o crescimento) e giberelinas (para a floração) ou, em opção, fazerem-se aplicações foliares destes reguladores de crescimento. Quando se registar alguma atividade substancial, deverá aumentar-se aos poucos a concentração de açúcar no meio e passar de forma gradual (com o aumento progressivo da concentração de sais) para meios nutritivos com baixas concentrações salinas.

Este protocolo terá, contudo, que ser muito melhorado, para que se consiga material mais reativo com abrolhamento dos gomos axilares dos rebentos primaveris *in vitro* onde se poderão encontrar estruturas femininas diferenciadas.

Para além do procedimento acima descrito poderiam ser experimentadas ainda outras vias. Uma hipotética via poderia ser desenvolvida através da indução de flores em ramos destacados mantidos em condições controladas, a partir de material adulto selecionado e colhido no campo. Nesta perspetiva, seria necessário promover-se antes ao estudo dos fatores (ambientais, fisiológicos e genéticos) que regulam este processo nesta espécie na natureza. Ainda outra possível linha pode passar pela obtenção de flores a partir de tecidos já estabelecidos *in vitro*, em vez da sua instalação direta a partir de material colhido no campo, para sua polinização e fertilização *in vitro*. A indução floral *in vitro* já foi reportada no sobreiro a partir de tecidos jovens já instalados *in vitro* e de plantas que se desenvolveram no campo (Mulin e Pais, 2003). Todavia, estes autores alertaram que é necessário desenvolver-se mais trabalho para se compreender completamente este mecanismo de floração *in vitro* do sobreiro antes de se proceder à sua aplicação em programas de melhoramento genético. Avanços na obtenção de flores *in vitro* foram reportados noutras espécies lenhosas com interesse económico como a oliveira (Chaari-Rkhis *et al.*, 2006) ou a pereira (Harada e Murai, 1998) (para uma revisão sobre floração *in vitro* consultar Murthy *et al.*, 2012).

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alpuim, M. & Roldão, I C. F. (1993). *Quercus suber* L. breeding strategy for cork quality. *Annales des Sciences Forestières*, 50 (supple. 1), 444-447.
- Anten, N. P., Casado-Garcia, R., Pierik, R., & Pons, T. L. (2006). Ethylene sensitivity affects changes in growth patterns, but not stem properties, in response to mechanical stress in tobacco. *Physiologia Plantarum*, 128 (2): 274-282.0
- Boavida, L. C., Varela, M. C., & Feijó, J. A. (1999). Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.). I. The progamic phase. *Sexual Plant Reproduction*, 11: 347-353.
- Boavida, L. C., Silva, J. P., & Feijó, J. A. (2001). Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.). II. Crossing intra-and interspecific barriers. *Sexual Plant Reproduction*, 14: 143-152.
- Cabral, R. (1996). *Fenologia e variações sazonais nas relações hídricas e trocas gasosas de Quercus suber L. em condições de campo*. Relatório do trabalho final de curso de engenharia florestal. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Camilo-Alves, C., Clara, M. I., & Ribeiro, N.M. (2013). Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: a review. *European Journal of Forest Research*, 132, 411–432.
- Carrasquinho, I. (2000a). Melhoramento do sobreiro em Portugal – breve historial. O melhoramento genético do sobreiro constitui um empreendimento de várias gerações.... *Revista Investigação Agrária, Dezembro 2000*, 68,69. Estação Florestal Nacional – INIA.
- Carrasquinho, I. (2000b). Multiplicação vegetativa no melhoramento florestal. Técnicas de propagação: enxertia e estacaria de sobreiro. *Revista Investigação Agrária, Dezembro 2000*, 71. Estação Florestal Nacional – INIA.
- Carrasquinho, M. I. (2002). Propagação vegetativa de sobreiros selecionados. *Silva Lusitana*, 10 (1), 17-52.
- Carvalho, A., Machado, C., Ramos, & M., Pires, J. (1999). Ritmos de floração e frutificação do sobreiro em Monte Morais, Trás-os-Montes. *Revista Biologia*, 17: 159-168.
- Carvalho, M. C. (1992). Estudos preliminares com vista ao estabelecimento de plantas de *Quercus suber* L. *in vitro*. Trabalho final de curso CESE – engenharia de multiplicação de plantas. ESAS-IPS. Santarém.
- Chaari-Rkhis, A., Maalej, M., Messaoud, S. O., & Drira, N. (2006). *In vitro* vegetative growth and flowering of olive tree in response to GA3 treatment. *African Journal of Biotechnology*, 5 (22): 2097-2302.
- Chalupa V (1987) European hardwoods. In: Bonga JM, Durzan DJ (Eds.), *Cell and tissue culture in forestry*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp 224–246.
- Chalupa, V. (1993). Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. *Annales des Sciences Forestières*, 50 (1): 295-307.
- Corti, R. (1955). Ricerche sul ciclo riproduttivo di specie del genere *Quercus* della flora italiana. II. Contributo alla biologia ed alla sistematica di *Quercus suber* L. e in particolare delle forme a sviluppo biennale della ghianda. *Annali della Accademia Italiana di Scienze Forestali*, 4: 55–133.
- DGDR (Direcção Geral de Desenvolvimento Rural) (2000). *O Sobreiro e a Cortiça. Um Património Universal uma Herança a conservar*. Ministério da agricultura, do desenvolvimento Rural e das Pescas. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural. Direcção-Geral de Desenvolvimento Rural. Lisboa.
- Díaz-Fernández, P. M., Climent, J., & Gil, L. (2004). Biennial acorn maturation and its relationship with flowering phenology in Iberian populations of *Quercus suber*. *Trees*, 18: 615-621.
- El Kbiach, M. L., Lamarti, A., Abdali, A., & Badoc, A. (2002a). Culture *in vitro* des bourgeons axillaires de chêne-liège (*Quercus suber* L.) I-Influence des cytokinines sur l'organogenèse et la callogenèse de noeuds de plantules. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 141: 73-88.

- El Kbiach, M. L., Lamarti, A., Abdali, A., & Badoc, A. (2002b). Culture *in vitro* des bourgeons axillaires de chêne-liège (*Quercus suber* L.) II-Influence des régulateurs de croissance sur la multiplication et l'enracinement. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 141: 89-104.
- El Kbiach, M. L., Lamarti, A., Abdali, A., & Badoc, A. (2004). Micropropagation du Chêne-liège (*Quercus suber* L.) par bourgeonnement axillaire. *Acta Botanica Gallica*, 151 (4): 415-427.
- Elena-Rossello, J. A., de Rio, J. M., Garcia Valdecantos, J. L., & Santamaria, I. G. (1993). Ecological aspects of the floral phenology of the cork-oak (*Q. suber* L.): Why do annual and biennial biotypes appear?. *Annals of Forest Science*, 50 (1): 114-121.
- EUFORGEN (2009). Distribution map of cork oak (*Quercus suber*), www.euforgen.org.
- Evers, P., Vermeer, E., & Van Eeden, S. (1993). Rejuvenation of *Quercus robur*. *Annales des Sciences Forestières*, 50 (1): 330-335.
- Feijó, J. A., Certal, A. C., Boavida, L., Van Nerum, I., Valdivieso, T., Oliveira, M. M., & Broothaerts, W. (1999). Advances on the study of sexual reproduction in the cork-tree (*Quercus suber* L.), chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and in Rosaceae (apple and almond). In: Cresti, M., Cai, G., Moscatelli, A. (Eds.), *Fertilization in Higher Plants* (pp. 377-396). Springer Berlin Heidelberg.
- Franco, J. A. (1971). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Volume 1. Lycopodiaceae-Umbelliferae*. Sociedade Astória, Lda. Lisboa. pp 55-58
- Gadanhó, A. M. (2000). *Métodos de propagação do sobreiro*. Relatório do trabalho final de curso em engenharia agrónomica. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- García-Mozo, H., Hidalgo, P. J., Galán, C., Gómez-Casero, M. T., & Domínguez, E. (2001). Catkin frost in Mediterranean cork-oak (*Quercus suber* L.). *Israel Journal of Plant Sciences*, 9: 41-47.
- Gebhardt, K., Heineker, B., & Weisgerber, H. (1992). Stump sprouts: a valuable source for clonal propagation and germplasm preservation of adult sessile oak. *Woody Plant Biotechnology*: 341-343.
- Gebhardt, K., Frühwacht-Wilms, U., & Weisgerber, H. (1993). Micropropagation and restricted-growth storage of adult oak genotypes. *Annales des Sciences Forestières*, 50 (1): 323-329.
- Gil, L., & Varela, M.C. (2008). EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for cork oak (*Quercus suber*). Bioversity International, Rome, Italy.
- Gomes, A. L.. (1989). Regeneração e melhoramento genético do montado de sobreiro. "*Identificação de Prioridades e Recursos de I&D sobre Cortiça*", *Workshop organizado pela Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Lisboa, 13-14 Julho 1988*, pp. 67-78.
- Gómez-Casero, M. T., Hidalgo, P. J., García-Mozo, H., Domínguez, E., & Galán, C. (2004). Pollen biology in four Mediterranean *Quercus* species. *Grana*, 43: 22-30.
- Gómez-Casero, M. T., Galán, C., & Domínguez-Vilches, E. (2007). Flowering phenology of Mediterranean *Quercus* species in different locations (Córdoba, SW Iberian Peninsula). *Acta Botanica Malacitana*, 32: 127-146.
- Gonçalves, J., & Rainho, C. (1992). Micropropagação de sobreiros (*Q. suber* L.) por rebentamento axilar. *Actas do II Encontro sobre os Montados de Sobreiro e Azinho*. pp. 109-118.
- Gričar, J. 2007. Xylo- and phloemogenesis in silver fir (*Abies alba* Mill.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). PhD Thesis, Slovenian Forestry Institute, University of Ljubljana, Ljubljana, 106 p.
- Harada, H., & Murai, Y. (1998). *In vitro* flowering on long-term subcultured pear shoots. *Journal of horticultural science & biotechnology*, 73 (2): 225-228.
- Jato, V., Rodríguez-Rajo, F. L., Méndez, J., & Aira, M. J. (2002). Phenological behaviour of *Quercus* in Ourense (NW Spain) and its relationship with the atmospheric pollen season. *International Journal of Biometeorology*, 46: 176-184.
- Jato, V., Rodríguez-Rajo, F. L., & Aira, M. J. (2007). Use of *Quercus ilex* subsp. *ballota* phenological and pollen-production data for interpreting *Quercus* pollen curves. *Aerobiologia*, 23: 91-105.

- Juncker, B., & Favre, J. M. (1989). Clonal effects in propagating oak trees via *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19 (3): 267-276.
- Kartsonas, E., & Papafotiou, M. (2007). Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90 (1): 111-116.
- Liu, J., Zhang, H., Cheng, Y., Kafkas, S., & Güney, M. (2014). Pistillate flower development and pollen tube growth mode during the delayed fertilization stage in *Corylus heterophylla* Fisch. *Plant Reproduction*, 27: 145–152.
- Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society*, 30: 421-427.
- Lorenzo, J. F., Otero, E., & Veiga, M. (2001, June). Micropropagación de clones seleccionados de *Quercus robur* L. In *Congresos-CARGA FINAL*.
- Manzanera, J. A., & Pardos, J. A. (1990). Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L.. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 21: 1-8.
- McCown, B. H. (2000). Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: Dealing with genetic predeterminism. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36 (3): 149-154.
- Meier-Dinkel, A., Becker, B., & Duckstein, D. (1993). Micropropagation and ex vitro rooting of several clones of late-flushing *Quercus robur* L. *Annales des Sciences Forestières*, 50 (1): 319-322.
- Moreira, A. R. (2005). *Estudos de floração e de frutificação em sobreiro (Quercus suber L.) num montado de sobreiro da península de Setúbal*. Relatório do trabalho de fim de curso de engenharia florestal. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Mulin, M., & Pais, M. S. S. (2003). *In vitro* floral induction from thin longitudinal sections and micro-cuttings of juvenile cork oak material. *Trees*, 17: 228-236.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15 (3): 473-497.
- Murthy, K. S. R., Kondamudi, R., Chalapathi Rao, P. V., & Pullaiah, T. (2012). *In vitro* flowering-A review. *Journal of Agricultural Technology 2012*, 8 (5): 1517-1536.
- Natividade, J. V. (1934). *Cortiças. Contribuição para o estudo do Melhoramento da Qualidade*. Publicações DGSFA, Vol. I. Lisboa.
- Natividade, J. V. (1950). *Subericultura*. Ministério da Economia - Direção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas. Lisboa. pp 101-104
- Nóbrega, F.; Vidal, R.; Sardinha, R.; Bruno de Sousa, R. (2002). Melhoramento do sobreiro: contributos estratégicos em curso. In: Bruno de Sousa, R. (Ed.), *Coletânea dos trabalhos publicados no âmbito do estudo do Património Genómico do Sobreiro*. Lisboa.
- Oliveira, G., Correia, O., Martins-Loução, M. A., & Catarino, F. (1994). Phenological and growth patterns of Mediterranean oak *Quercus suber* L.. *Trees*, 9: 41-46.
- Oliveira, M. G. (1995). *Autecologia do sobreiro (Quercus suber L.) em montados portugueses*. Tese de doutoramento em Biologia (Ecologia e Biossistemática). FCUL, Lisboa. pp 31
- Ostrolucka, M. G., Gajdošová, A., & Libiakova, G. (2007). Protocol for micropropagation of *Quercus* spp. In: S., Häggman, H. (Eds.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* (pp. 85-91). Springer Netherlands.
- Patrício, C. A. (2004). *Estudos de biologia reprodutiva do sobreiro (Quercus suber L.) e em carvalho cerquinho (Quercus faginea Lam.)*. Relatório de fim de curso de engenharia florestal. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

- Pereira Coutinho, A. X. (1936). *Esboço de uma flora lenhosa Portuguesa*. 2ª Edição – actualizada. Direção Geral do Serviços Florestais e Aquícolas. Volume III – Tomo I. Lisboa.
- Pereira Coutinho, A. X. (1939). *Flora de Portugal (Plantas Vasculares)*. 2ª edição. Bertrand (Irmãos) Lda. Lisboa. pp 196, 200, 201
- Pinto, C. M. (2013). *Responses of cork oak and holm oak to environmental constraints. Avoiding and/or tolerating drought*. Tese de doutoramento em engenharia florestal e dos recursos naturais. Instituto Superior de Agronomia - Universidade de Lisboa. Lisboa.
- Pons, J., & Pausas, J. G. (2012). The coexistence of acorns with different maturation patterns explains acorn production variability in cork oak. *Oecologia*, 169: 723-731.
- Prewein, C., Endemann, M., Reinohl, V., Salaj, J., Sunderlikova, V., & Wilhelm, E. (2006). Physiological and morphological characteristics during development of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) zygotic embryos. *Trees*, 20: 53–60.
- Puddephat, I. J., Alderson, P. G., & Wright, N. A. (1997). Influence of explante source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 48 (4): 951-962.
- Puddephat, I. J., Alderson, P. G., & Wright, N. A. (1999). *In vitro* root induction in axillary microshoots of *Quercus robur* L.. *Annals of Applied Biology*, 134 (2): 233-239.
- Purohit, V. K., Tamta, S., Chandra, S., Vyas, P., Palni, L. M. S., & Nandi, S. K. (2002). *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: Important Himalayan oaks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69 (2): 121-133.
- Reforço, M. I. (1997). *Aspectos do comportamento reprodutivo do Quercus suber L. num montado de sobreiro na península de Setúbal*. Relatório do trabalho de fim de curso de engenharia florestal. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Ribeiro, M. M. (1995). Bases para um programa de melhoramento florestal da espécie *Quercus suber* L. *Revista Florestal*, 8 (1): 23-39.
- Roldão, M. I. (1986). Perspectivas para o Melhoramento Florestal da Espécie *Quercus suber* L.. *Livro de Comunicações do "1º Congresso Florestal Nacional"*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. pp. 117-119.
- Roldão, M. I. (1995). A propagação vegetativa e o melhoramento florestal. Casos do pinheiro bravo e sobreiro. *Actas das Primeiras Jornadas de Multiplicação Vegetativa: 4-11*. Instituto Nacional de Investigação Agrária – Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade.
- Roldão, M. I. (2000). *Propagação vegetativa de sobreiros selecionados*. Tese de doutoramento em engenharia florestal. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Romano, A., & Martins-Loução, M.A. (1992). Micropropagation of mature cork-oak (*Quercus suber* L.): Establishment problems. *Scientia Gerundensis*, 18: 17-27
- Romano, A., Noronha, C., & Martins-Loução, M.A. (1992a). Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L.. *Annals of Botany*, 70: 531-536.
- Romano, A., Noronha, C., Caçorino, A. I., & Martins-Loução, A. (1992b). Técnicas de propagação aplicadas ao melhoramento do sobreiro. *Livro de Comunicações do Segundo Encontro de Montados de Sobreiro e Azinho*. pp. 196-202, Évora, 4 e 5 de Junho de 1992.
- Romano, A. (1994). *Estudos in vitro em Quercus suber L.: micropropagação, micorrização e conservação*. Tese de doutoramento em Biologia (Biologia Vegetal). Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa.
- Romano, A., Noronha, C., & Martins-Loucao, M. A. (1995). Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40: 159-167.
- Romano, A., & Martins-Loução, M.A. (2003). Strategies to Improve Rooting and Acclimatization of Cork Oak. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 616: 275-278.

- Sá, A. C. (1995). *Estudos de floração e frutificação no sobreiro (Quercus suber L.)*. Relatório do trabalho de fim de curso de engenharia florestal. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Sanchez, M. C., San-Jose, M. C., Ballester, A., & Vieitez, A. M. (1996). Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree physiology*, 16: 673-680.
- San-José, M. C., Ballester, A., & Vieitez, A. M. (1988). Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus robur* L.. *Tree Physiology*, 4 (3): 281-290.
- San-Jose, M. C., Vieitez, A. M., & Ballester, A. (1990). Clonal propagation of juvenile and adult trees of sessile oak by tissue culture techniques. *Silvae Genetica*, 39 (2): 50-55.
- SROA (1969). *Carta de Solos de Portugal 1/50 000*, folha 38-B. Serviço de Reconhecimento e Ordenamento Agrário SROA, Secretaria de Estado da Agricultura, Min. da Economia, Lisboa
- Tamta, S., Palni, L. M. S., Purohit, V. K., & Nandi, S. K. (2008). *In vitro* propagation of brown oak (*Quercus semecarpifolia* Sm.) from seedling explantes. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44 (2): 136-141.
- Valdiviesso, T. (1991). *Biologia Floral da Nogueira (J. regia L.)*. Tese de Mestrado. Estação Nacional de Fruticultura de Vieira Natividade. Instituto Nacional de Investigação Agrária. Alcobaca. 85p.
- Valdiviesso, T. (1999). *Estudo sobre a Reprodução Sexuada e Caracterização de Cultivares de Castanea sativa Mill.*. Trabalho síntese apresentado para as provas de acesso à categoria de Investigadora Auxiliar. Estação Nacional de Fruticultura de Vieira Natividade. Instituto Nacional de Investigação Agrária. Alcobaca.
- Valdiviesso, T., & Costa, R. L. (2006). Polinizações Controladas em *Castanea* spp. e Caracterização da Descendência e Progenitores por Microsatélites. *Silva Lusitana*, 14 (1): 23 – 31.
- Varela, M. C. (1994). Overview on ongoing research in *Q. suber* L. in Portugal. Proceedings of the workshop on inter and intraspecific variation in European oaks: Evolutionary implications and practical consequences. Brussels (BE) 15-16 June 1994 pp 277-294 . Agro-Industrial Research Division DG XII-E.2 EUR 16717 EN. Office for Official Publications of the European Communities. Brussels.Luxembourg.
- Varela, M. C. e Eriksson, G. (1995). Multipurpose gene conservation in *Quercus suber* – a Portuguese exemple. *Silvae Genetica* 44 (1): 28-37.
- Varela, M. C., & Valdiviesso, T. (1996). Phenological phases of *Quercus suber* L. flowering. *Forest Genetics*, 3 (2): 93-102.
- Varela, M. C. (1997). Regions of Provenance for cork oak in Portugal. In *Quercus suber* Network, Report of the third and fourth meetings 09-12 Jun 1996 Italy, 20-22 Feb Spain.
- Varela, M. C. (2007). *Processo do Símbolo da Cortiça, Cork@Mark*. Ed. Estação Florestal Nacional, Oeiras, Portugal.
- Varela, M. C., Brás, R., Barros, I. R., Oliveira, P., & Meierrose, C. (2008). Opportunity for hybridization between two oak species in mixed stands as monitored by the timing and intensity of pollen production. *Forest Ecology and Management*, 256: 1546-1551.
- Varela, M. C., & Valdiviesso, T. (2011). Cork Oak phenology. UISPF, Instituto Nacional de Recursos Biológicos IP (INIA), Oeiras, Portugal
- Varela, M. C., Valdiviesso, T., & GENOSUBER Consortium (2014). Controlled pollination in cork oak (*Quercus suber* L.) to support its genome sequencing project GENOSuber. *XXIII International Congress on Sexual Plant Reproduction*. Porto.
- Vengadesan, G., & Pijut, P. M. (2009). *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45 (4): 474-482.
- Vieitez, A. M., Pintos, F., San-Jose, M. C., & Ballester, A. (1993). *In vitro* shoot proliferation determined by explante orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L.. *Tree Physiology*, 12: 107-117.

Vieitez, A. M., Sánchez, M. C., Amo-Marco, J. B., & Ballester, A. (1994). Foreed flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explantes of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37 (3): 287-295.

Vieitez, A. M., Corredoira, E., Ballester, A., Muñoz, F., Durán, J., & Ibarra, M. (2009). *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98 (2): 135-145.

Vieitez, A. M., Corredoira, E., Martínez, M. T., San-José, M. C., Sánchez, C., Valladares, S., Vidal, N., & Ballester, A. (2012). Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *European Journal of Forest Research*, 131 (3): 519-539.

Vinagre, P. R., Santos, L., Nóbrega, F., & Varela, M. C. (2005). Estudos comparativos entre as duas primeiras frutificações do sobreiro: bastão e lande. 5º Congresso Florestal "A Floresta e as Gentes". Viseu.

VI. ANEXOS

ANEXO I

(Composição basal dos meios de cultura MS e WPM)

Quadro 6: Composição química basal dos meios nutritivos MS e WPM, expressa em mg/l.

Componentes	MS	WPM
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	1650	400
KNO ₃	1900	-
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	72,5 (anidro)
Ca(NO ₃) ₂	-	386
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	180,7 (anidro)
KH ₂ PO ₄	170	170
K ₂ SO ₄	-	990
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	-
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,25
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	27,85
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3	22,3
KI	0,83	-
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	8,6
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37,2	37,3
Vitaminas		
mio-Inositol	100	100
Ácido nicotínico		0,5
Niacina	0,5	-
Piridoxina HCl	0,5	0,5
Timina HCl	0,1	1
Glicina	2,0	2,0

ANEXO II
(Ficha de recolha de dados fenológicos)

CARACTERIZAÇÃO FENOLÓGICA DAS ÁRVORES		DATA:	PARCELA : Quinta da Serra	
ESTADO DO TEMPO		NEBULOSIDADE -		PRECIPITAÇÃO -

ÁRVORE Nº	Vigor	Desenv. do Gomo e da folha										Floração ♂								Floração ♀								Frutificação							
		Estádios										Estádios								Estádios															
		Abrolhamento	Dormente	Along escamas	Gomo lanudo	Folha visível	Orelha de rato	Along eixo	Folha expan n atempada	Along eixo	Folha atempada	Grau	C	D	E	F	Fm	G	H	OBSERVAÇÕES	Grau	C	D	E	Ff	G	H	OBSERVAÇÕES	Grau Bastão	Estadio	Grau frut do ano	Estadio	OBSERVAÇÕES		
1																																			
2																																			
3																																			
4																																			
5																																			
6																																			
7																																			
..																																			

Figura 18: Cabeçalho de uma ficha de registos fenológicos da Quinta da Serra.

ANEXO III

(Relação entre morfologia externa e anatomia nas flores femininas e frutos)

Quadro 7: Relação entre a morfologia externa e a anatomia, nas fases fenológicas do desenvolvimento floral feminino Ff, Gf e Hf e nas fases fenológicas dos frutos desde o estágio 1 ao estágio 5.

Fase Fenológica	Morfologia Externa	Anatomia - Evolução Ontogenética
Ff	Estigmas distintos, eretos e amarelos com pontas curvas rosadas/acastanhadas. Na plena recetividade (F2f) os estigmas encontram-se intumescidos em posição divergente, de aspeto amarelo brilhante e viscoso.	Apenas os estigmas e estiletes se encontram diferenciados, distinguindo-se o tecido transmissivo que liga estigmas e estiletes e se prolonga até ao local onde o ovário se diferenciará. Na base da flor pode encontrar-se a cavidade ovárica.
Gf	Perda de recetividade em alguns estigmas que se tornam opacos castanho amarelados	Organização do ovário com crescimento dos septos e conseqüente formação dos lóculos. Aparecimento de primórdios de óvulos nas paredes dos septos. Podem, por vezes, distinguir-se óvulos mais desenvolvidos no final desta fase. O diâmetro do ovário quase não aumenta. A cúpula começa a envolver os tecidos do ovário. Migração dos tubos polínicos (pelo menos até à base dos estiletes) e perda de recetividade dos estigmas.
Hf	Todos os estigmas perdem a recetividade exibindo uma cor castanha escura. Nesta fase observa-se um aumento considerável do diâmetro ao nível do ovário.	Desenvolvimento dos óvulos com a máxima diferenciação dos tegumentos externos e internos e do nucelo. Ocorre a megasporogénese (formação do megásporo) e a megagametogénese (desenvolvimento e maturação do saco embrionário). Aumento do diâmetro a nível do ovário (de 1 para 2/3 mm) devido ao desenvolvimento dos óvulos, da parede do ovário (futuro pericarpo) e da cúpula. A cúpula envolve completamente os tecidos do ovário.
Fecundação	Secção transversal no ovário (ovário+cúpula) regista diâmetros entre 3 e 4 mm.	
Estádio 1 do fruto	Fruto completamente envolvido por uma cúpula escamosa fechada, frequentemente com estigmas secos no plano distal.	Embriogénese. O embrião chega ao máximo estado de diferenciação. Começo da fase de desenvolvimento cotiledonar.
Estádio 2 do fruto	Abertura da cúpula e aparecimento da ponta verde do fruto no plano distal.	Comprimento do eixo embrionário aumenta para o triplo. Tornam-se distinguíveis os primórdios das folhas cotiledonares. Cotilédones envolvem os restantes tecidos do embrião e são os principais responsáveis pelo aumento de volume.
Estádio 3 do fruto	Fruto verde já emergiu notoriamente da cúpula.	Novo aumento do tamanho do embrião tanto a nível do eixo embrionário (para tamanhos muito próximos do final) como a nível dos cotilédones.
Estádio 4 do fruto	Fruto apresenta um tamanho praticamente definitivo mas ainda com cor verde.	O eixo embrionário praticamente não sofre alterações registando-se comprimentos na ordem dos 3 mm (da extremidade da coifa ao meristema caulinar). Os cotilédones são os responsáveis pelo aumento de volume verificado na maioria dos frutos entre os estádios 3 e 5.
Estádio 5 do fruto	Fruto maduro de cor castanha e tamanho definitivo.	