

Comunicações Oraís

Estimativa do Parentesco numa População de Melhoramento de *Eucalyptus globulus* através de Microsatélites Nucleares

Maria Margarida Ribeiro¹, Leopoldo Sánchez², Nuno Borralho⁴ e Cristina M. Marques³

¹Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Unidade Departamental de Silvicultura e Recursos Naturais, 6001-909 CASTELO BRANCO

²INRA - Centre d'Orléans, Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestière, 45166 Olivet, FRANCE

³RAIZ-Direcção de Investigação Florestal, IBET/ITQB II. Quinta do Marquês, Av. República, 2780-157 OEIRAS

⁴BorralhoIDea, Urbanização S. Francisco, 18, 2070-220 CARTAXO

Resumo. É situação comum desconhecer-se o grau de parentesco entre a população na origem da maioria dos programas de melhoramento genético de espécies florestais. Para resolver este problema, desenvolvemos um protocolo de avaliação do parentesco utilizando 125 indivíduos e 16 microsatélites, da população base ou de referência (PR) de *Eucalyptus globulus* do RAIZ. Através da recombinação gamética *in silico* foram simulados 10⁵ indivíduos com diferentes graus de parentesco: descendentes de autopolinização, meios-irmãos, irmãos completos e indivíduos não aparentados. Por simulação Monte-Carlo foram calculados o valor médio e a variância associada à média dos diferentes grupos de parentesco, com quatro coeficientes de similaridade genética. Compararam-se as funções densidade dos diferentes grupos de parentesco, obtidas com quatro coeficientes de parentesco, utilizando o valor crítico correspondente à intercepção das funções densidade dos indivíduos não aparentados e dos meios-irmãos. O estimador escolhido foi aplicado à PR. Detectaram-se 4,4% de pares de indivíduos potencialmente aparentados, com um erro de tipo II de 8%. Inferimos também, o parentesco de um conjunto de 24 clones elite e encontramos 4 pares que são potencialmente aparentados. Futuros cruzamentos entre estes indivíduos deverão ser evitados.

Palavras-chave: Microsatelites, *Eucalyptus globulus*, parentesco, melhoramento

Abstract. Founders in tree genetic improvement populations programs usually lack *pedigree* (degree of coancestry) information. To evaluate the genetic similarity between trees in RAIZ base population we genotyped a sample of 125 *Eucalyptus globulus* individuals with 16 microsatellites (SSR) - the reference population (RP). Simulated individuals (10⁵) were obtained through gamete recombination, according to different relatedness groups: selfed, half-sib, full-sib and unrelated individuals. The r-values and sampling variances of self, full-sib, half-sib and unrelated individuals were calculated through Monte-Carlo simulations using four pairwise similarity coefficients. The density functions of the relatedness groups were compared by using as threshold the value corresponding to the interception of the probability distribution curves of the unrelated and the half-sib individuals - the critical value. With the selected relatedness estimator 4.4% of individuals putatively related were detected in the RP, with a type II error of 8%. Additionally, the relatedness among 24 *E. globulus* elite individuals was verified, and four pairs of elite individuals were considered to be putatively related. Future crosses amongst these trees should be avoided.

Key words: Microsatellites, *Eucalyptus globulus*, relatedness, improvement

Introdução

Portugal tem condições únicas, na Europa, para a produção de rolaria de eucalipto destinada a pasta de papel, dadas as condições edafo-climáticas excelentes, especialmente para a espécie *Eucalyptus globulus*. Além disso, Portugal tem vindo a liderar o melhoramento genético desta espécie (BORRALHO *et al.*, 2007), considerada a melhor para a produção de papel de qualidade. A população de melhoramento genético base deve reflectir a maior diversidade genética possível e deve haver cuidado para que o consecutivo melhoramento da espécie não leve a uma redução excessiva da variabilidade genética, por excesso de consanguinidade entre as árvores seleccionadas. É por isso importante monitorizar o nível de diversidade genética nos diferentes passos do ciclo de melhoramento, com destaque para restrições na realização de cruzamentos controlados entre árvores aparentadas, para isso, o parentesco entre os genitores seleccionados deve ser conhecido ou investigado (BALLOU e LACY, 1995).

Na população portuguesa de *E. globulus*, como aliás na maioria dos casos, não existe informação detalhada sobre o *pedigree* dos seus fundadores ou população genética de base. O *pedigree* das árvores ou o seu respectivo grau de parentesco pode ser determinado através de marcadores moleculares, em particular microsátélites. Estas estimativas são importantes para inferir o grau de parentesco entre material elite de *pedigree* desconhecido e ajudar no desenho de cruzamentos controlados. Diferentes estimadores baseados em marcadores moleculares têm sido propostos para estimar o parentesco na ausência de *pedigree* conhecido e têm sido utilizados em diferentes áreas de investigação (revistos por BLOUIN, 2003 e THOMAS, 2005). Os estudos publicados até agora, geralmente concordam que não existe um coeficiente que seja universalmente superior aos outros e que o seu comportamento depende do grau de parentesco que se pretende estimar, da capacidade informativa do marcador (número de loci e número e frequência de alelos por locus) e da amostra utilizada para estimar as frequências alélicas (CSILLERY *et al.*, 2006; VAN DE CASTEELE *et al.*, 2001; WANG, 2002). Neste estudo foram utilizados quatro coeficientes de parentesco muito comuns: RITLAND (1996) (R), QUELLER e GOODNIGHT (1989) (Q), LYNCH e RITLAND (1999) (LR) e LI (1993) (L).

Para seleccionar o melhor estimador recorreremos a vários critérios, usando simulações Monte-Carlo: 1) maior precisão, ou seja, intervalos de confiança mais pequenos relativamente à média, 2) uma *soma-p* mais pequena, definida como a soma de todos os valores *p* (probabilidade associada ao teste de t) de todas as comparações entre estimativas de grupos de parentesco, partindo da hipótese nula que a média do grupo de parentesco *x* iguala a média do grupo de parentesco *y* ($x \neq y$) e 3) menor área de sobreposição entre cada duas funções densidade de parentesco adjacentes.

Neste estudo foram usados 16 marcadores microsátélites para genotipar 125 indivíduos da população base de melhoramento de *E. globulus*. Estes indivíduos não têm origem (raça nativa) conhecida, tendo sido seleccionados originalmente em plantações exóticas em Portugal, geograficamente distantes e, também, em povoamentos naturais na Austrália. Esta informação será muito relevante para uma boa gestão das populações de melhoramento e especialmente para monitorizar o parentesco do material comercializado. Foram objectivos deste artigo: i) obter estimativas de parâmetros genéticos para o conjunto de marcadores microsátélites utilizados, incluindo o seu poder discriminante (D), ii) seleccionar o estimador de parentesco com melhor comportamento e iii) aplicar o estimador escolhido à

população de referência e a um conjunto de 24 clones elite usados para comercialização pelo RAIZ.

Material e métodos

A população de referência (PR) incluiu 125 árvores sem parentesco conhecido, mas supostamente não relacionadas, representativas da população fundadora do programa de melhoramento do RAIZ (Instituto de Investigação da Floresta e Papel). A PR e um conjunto de 24 clones elite foram genotipados com 16 microsátélites, após a extracção do ADN total de acordo com o método descrito por MARQUES (1998). Os 16 microsátélites utilizados, foram seleccionados com base no número de alelos e efectivo número de alelos (tabela 1) e foram caracterizados por BRONDANI (1998), STEANE (2001) e BRONDANI (2002). Considerámos que todos os marcadores utilizados neste estudo tinham segregação independente, porque os testes de desequilíbrio de ligamento não foram significativos, após a correcção Bonferroni.

Na análise de parentesco, foram utilizados os coeficientes de parentesco de RITLAND (1996) (R), de QUELLER e GOODNIGHT (1989) (Q), de LYNCH e RITLAND (1999) (LR) e de LI (1993) (L). Usando um programa construído para efectuar a análise dos dados (*Zeta*, que pode ser obtido junto do co-autor LS: Leopoldo.Sanchez@orleans.inra.fr), foram simulados 10^5 indivíduos com diferentes graus de parentesco: descendentes de autopolinização (DA), meios-irmãos (MI), irmãos completos (IC) e indivíduos não aparentados (NR) a partir da PR, através da recombinação gamética *in silico*. Foram calculados os valores médios e a variância associada à média dos diferentes grupos de parentesco com os quatro coeficientes de similaridade genética, utilizando simulações Monte-Carlo e determinados os intervalos de confiança com base no erro de amostragem.

Um dos parâmetros calculados para escolher o estimador com o melhor comportamento, foi a *soma-p* de cada coeficiente, que foi definida como a soma de todos os valores *p* (probabilidade associada ao teste de t) de todas as comparações entre estimativas de grupos de parentesco, partindo da hipótese nula que a média do grupo de parentesco *x* iguala a média do grupo de parentesco *y* ($x \neq y$) (figura 1).

Foram também efectuadas comparações não paramétricas baseadas na percentagem de sobreposição das distribuições dos valores médios para cada coeficiente de parentesco, através da integração da distribuição dos 10.000 valores simulados, entre todas as funções densidade, isto é, NR-MI, NR-IC, NR-DA, MI-IC, MI-DA e IC-DA. As áreas de sobreposição foram calculadas no *R statistical package* (R Development Core Team 2008).

Compararam-se as funções densidade dos diferentes grupos de parentesco obtidas com quatro coeficientes de parentesco, utilizando o valor crítico correspondente à intercepção das funções densidade dos indivíduos não aparentados e dos meios-irmãos.

Os parâmetros genéticos, número de alelos por locus (N_a), número efectivo de alelos (N_e), heterozigocidade esperada (H_e) e heterozigocidade observada (H_o), foram calculados com o referido programa *Zeta*, assim como o poder discriminante (D) de cada marcador, definido como a probabilidade de um marcador conseguir discriminar entre padrões genéticos diferentes num conjunto de comparações para aquele marcador na PR. A matriz de parentesco calculada com os valores do coeficiente LR para todos os pares de indivíduos dos 24 clones elite foi usada para obter o dendrograma UPGMA (figura 2), usando o programa *NTSYSpc*, versão 2.1 (ROHLF, 1993).

Resultados e discussão

A heterozigocidade média referida na literatura para o *E. globulus*, usando marcadores SSR foi similar ao valor obtido no presente estudo ($\sim 0,85$; tabela 1). O H_o obtido foi geralmente mais baixo (0,66, STEANE *et al.* (2001) e 0,62, JONES *et al.* (2002)) do que o valor que nós determinámos (0,73), mas o número de loci utilizados nestes estudos foi sempre muito menor. O facto de estarmos a utilizar uma população artificial pôde, também, aumentar H_o . Efectivamente, numa população de melhoramento desta espécie na Austrália (140 indivíduos) JONES *et al.* (2006) calcularam 0,82 e 0,71, respectivamente, para a heterozigocidade esperada e observada, mas o H_o era menor nas populações nativas (0,66) do que na população artificial que ele estudou. ASTORGA (2004) detectou valores semelhantes em *E. globulus* usando 26 marcadores SSR com árvores seleccionadas e, ensaios de progénie: $H_e=0,80$ e $H_o=0,70$. Noutros estudos com microsatélites em *E. grandis* e *E. urophylla*, a heterozigocidade média observada era muito menor do que a esperada ($H_o \sim 0,56-0,62$ and $H_e \sim 0,86-0,82$) (BRONDANI *et al.*, 2002; BRONDANI *et al.*, 1998).

Tabela 1 - Parâmetros de diversidade para os 16 SSR loci na população de referência, ordenados de acordo com D. Número de alelos por locus (N_a), número efectivo de alelos (N_e), heterozigocidade esperada (H_e), heterozigocidade observada (H_o) e poder discriminante observado (D)

	N_a	N_e	H_e	H_o	D
EMBRA23	21	12,8	0,93	0,89	0,991
EMBRA12	19	13	0,93	0,89	0,991
EMCRC8	18	12,8	0,93	0,84	0,987
EMBRA18	21	11,5	0,92	0,90	0,987
EMCRC11	16	8,9	0,89	0,83	0,981
EMBRA6	15	8,8	0,89	0,78	0,976
EMCRC10	18	8,6	0,89	0,65	0,960
EMBRA11	21	9,4	0,90	0,87	0,960
EMBRA2	15	6,2	0,84	0,76	0,959
EMBRA8	14	6,2	0,84	0,76	0,956
EMCRC7	14	4,8	0,79	0,70	0,932
EMBRA20	13	4,7	0,79	0,62	0,929
EMCRC2	15	4,5	0,78	0,62	0,915
EMBRA5	21	5,2	0,82	0,50	0,898
EMCRC5	21	5,5	0,81	0,53	0,898
EMBRA19	6	3,4	0,71	0,54	0,855
Média	16,8	7,9	0,85	0,73	0,948

BLOUIN (1996) conclui no seu estudo que 10 loci com $H_e = 0,75$ poderiam de forma precisa discriminar mais do que 90% dos irmãos completos de indivíduos não relacionados, mas seriam necessários 14 loci para conseguir a mesma discriminação entre irmãos completos e meios-irmãos. Nas circunstâncias do presente estudo as condições estão consideravelmente acima do requerido, pois só um marcador entre os 16 tem $H_e < 0,75$.

As estimativas de parentesco baseadas em marcadores moleculares têm, em geral, um erro de inferência grande (LYNCH e RITLAND, 1999; RITLAND, 1996). De facto, as variâncias obtidas são grandes e intrínsecas ao processo, devido à recombinação quando se formam os

gâmetas. Existem factores extrínsecos que afectam os comportamentos absolutos e relativos dos estimadores, como seja a distribuição das frequências alélicas, o número de alelos por locus e a relação real de parentesco. Devido à dependência das diferentes propriedades dos estimadores (enviesamento e variância) na distribuição das frequências génicas e padrões de parentesco, VAN DE CASTEELE (2001) sugere o uso de simulações Monte-Carlo com dados reais, para se poder determinar o coeficiente mais adequado para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

No nosso estudo usámos os genótipos conhecidos da população de referência para estabelecer um "*pool*" genético a partir do qual simulámos gâmetas, através do posicionamento aleatório dos alelos. Estes gâmetas virtuais foram cruzados em seguida de acordo com as diferentes classes de parentesco (NR, MI, IC e DA) e esta sequência de recombinação, segregação e cruzamento, foi repetida de forma a obter as curvas de densidade dos estimadores de parentesco. Com este procedimento não necessitamos de supor que a população está em EHW, porque as condições de recombinação aleatórias irão minimizar o desequilíbrio de ligamento. Este procedimento permitirá inferir resultados em qualquer população de melhoramento, que não estará de certeza em EHW, tal como acontece a nossa.

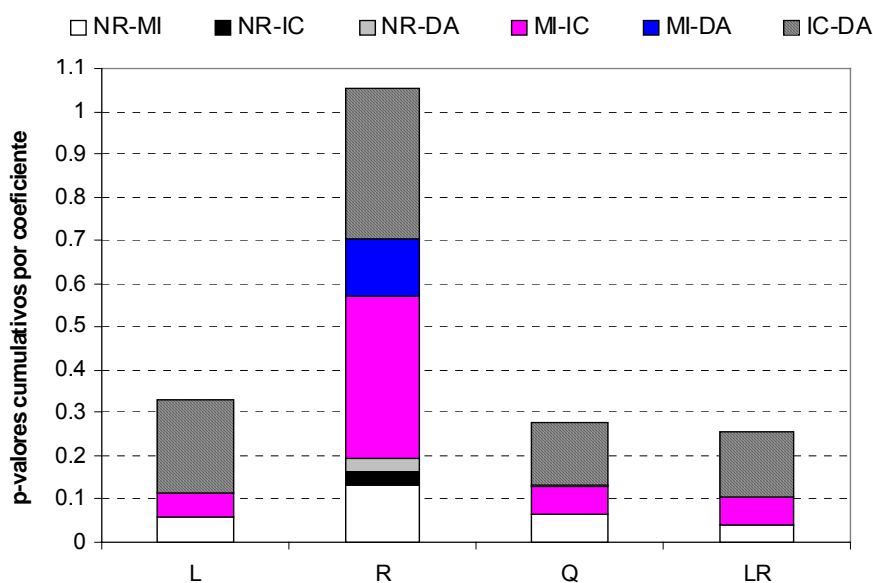


Figura 1 - Valores cumulativos dos p-valores (*soma-p*) de cada coeficiente de parentesco (significado das abreviaturas na secção de M & M)

O estimador LR parece ser o que melhor comportamento tem para o conjunto de dados, porque para além de preciso e não enviesado, teve a menor percentagem de sobreposição de áreas entre grupos de parentesco (tabela 2), intervalos de confiança mais pequenos (dados não apresentados) e *soma-p* mais pequena (figura 1). THOMAS (2005) refere que o estimador de LYNCH e RITLAND (1999) apresenta propriedades mais interessantes num espectro mais alargado de dados moleculares. CSILLERY (2006) estudou populações alogâmicas que eram menos relacionados do que meios-irmãos (a maioria dos pares tinha

valores de parentesco inferiores a 0,25) e concluíram que o estimador Q tinha menor erro de amostragem para categorias de parentesco mais elevadas e LR comportava-se melhor para relações de parentesco mais baixas. Os mesmos autores referiram que para todas as cinco populações que estudaram, a taxa de erro na classificação de parentesco era menor para o estimador LR. Concluíram, também, que a maior proporção da variância de parentesco real era explicada quando LR era utilizado, reflectindo o facto deste estimador ter uma variância mais pequena quando as categorias de parentesco baixas são mais comuns (NR ou pares pouco relacionado), o que é habitual em populações alogâmicas. No nosso estudo, queríamos distinguir indivíduos não relacionados de relacionados e precisámos, por isso, de um estimador que fosse mais sensível para indivíduos com baixo grau de parentesco. Os resultados do nosso estudo são confirmados por aqueles apresentados por RITLAND e TRAVIS (2004): o estimador LR tem um comportamento superior ao estimador R, no caso de graus mais elevados de parentesco e o último é mais sensível para valores mais baixos de parentesco. Na entanto, o estimador R não pode ser usado, porque as variâncias aumentam com o grau de parentesco esperado e torna-se impossível distinguir indivíduos pertencentes a diferentes grupos de parentesco (dados não apresentados). No estudo de um caso com populações cativas de papagaios, RUSSELLO e AMATO (2004) concluíram que a medida LR explicava a maior parte da variação na relação de parentesco verdadeira, comparada com o estimador Q. Concluindo, parece que o coeficiente LR tem um melhor comportamento no caso do nosso tipo de população, onde os indivíduos são, geralmente, não relacionados, e o estimador R é o que tem pior comportamento dos quatro estimadores que estudámos.

Tabela 2 - Áreas de sobreposição das distribuições de parentesco (%). NR=não relacionados, MI=meios-irmãos, IC=irmãos completos e DA= descendentes de autopolinização

	L	R	Q	LR	Média
NR-MI	21,49	15,45	21,87	15,53	18,58
NR-IC	1,32	2,23	1,40	0,67	1,40
NR-DA	0,07	0,31	0,03	0,00	0,10
MI-IC	19,38	44,35	21,78	21,00	26,63
MI-DA	2,48	16,80	1,83	1,56	5,67
IC-DA	38,35	45,50	31,13	30,87	36,46
Média	13,85	20,77	13,01	11,60	

Nós usámos o valor do parentesco correspondente à intercepção das distribuições de probabilidade obtidas com as simulações Monte-Carlo, como valor limite – valor crítico. O valor crítico minimiza os erros α e β (o β é a área de sobreposição à esquerda do valor crítico e o α é a área à direita). Dado o nosso interesse em distinguir um par de indivíduos aparentados num certo grau de um par de indivíduos não aparentados, o erro de tipo II torna-se mais importante, isto é, considerar um par não aparentado, quando efectivamente o é. O valor crítico obtido com a intercepção da curva dos indivíduos não relacionados com a curva dos meios-irmãos, calculadas com o estimador LR foi de 0,126 (um valor aliás próximo do valor esperado que é de 0,125), e o valor da área à esquerda foi de 8%. Assim sendo, os pares de indivíduos com valores superiores ao valor crítico podem estar associados a um certo grau de parentesco, pelo menos ao nível dos meios-irmãos (ver figura 2), com uma probabilidade de erro de tipo II de 8%.

O estimador escolhido foi aplicado à PR e detectámos 4,4% de pares de indivíduos potencialmente aparentados, com $\beta = 8\%$. Quatro pares de indivíduos potencialmente relacionados foram encontrados no conjunto dos 24 clones elite com o estimador LR (figura 2). No caso da população amostrada, eles constituem uma pequena proporção (1,4%) de todos os possíveis pares (276) na matriz de parentesco, um resultado promissor do ponto de vista da manutenção da diversidade genética da população de melhoramento.

Apesar da origem destes progenitores de base ser desconhecida, existiriam à partida oportunidades de ocorrerem parentescos insuspeito entre árvores da "raça" Portuguesa de eucalipto (BORRALHO *et al.*, 2007). Muitas das plantações onde foram seleccionados tiveram origem em plantações de semente colhida em poucas árvores, possivelmente com uma polinização restrita e com um pequeno número de árvores envolvidas..

O facto de a proporção de indivíduos aparentados na população de *E. globulus* do RAIZ ser baixa é uma boa notícia. Porém, este trabalho mostrou que na ausência de informação sobre o *pedigree*, as estimativas obtidas com base no coeficiente de LR a partir de marcadores moleculares podem ser úteis para se quantificar o grau de consanguinidade entre árvores na população de melhoramento.

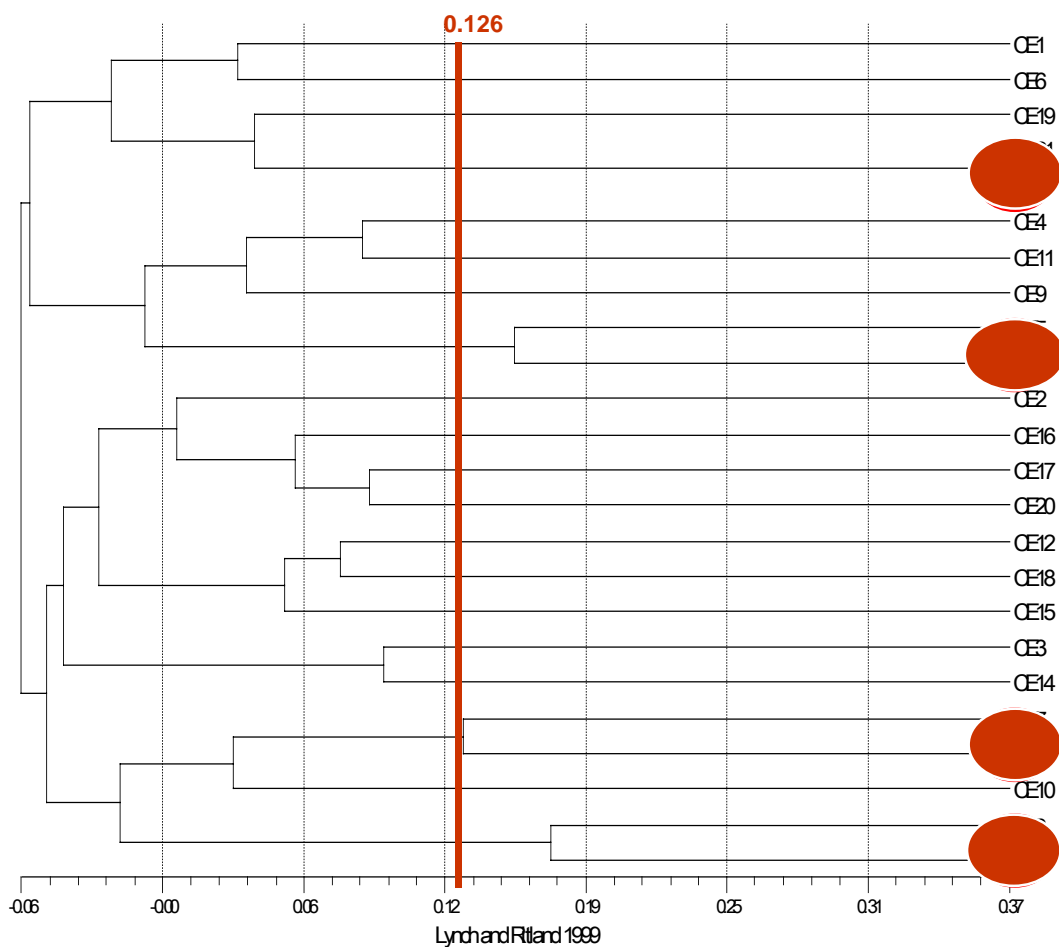


Figura 2 - Dendrograma de parentesco dos clones elite (UPGMA) construído com base na matriz de parentesco de LYNCH e RITLAND (1999)

Agradecimentos

Uma versão mais completa deste artigo foi submetida à revista *Trees Genetics & Genomes*.

Referências

- ASTORGA, R., SORIA, F., BASURCO, F., TOVAL, G., 2004. Diversity analysis and genetic structure of *Eucalyptus globulus* Labill. In: BORRALHO N.M.G., PEREIRA J.S., MARQUES C., COUTINHO J., MADEIRA M., TOMÉ M. (Eds.), *Eucalyptus in a Changing World*. IUFRO. RAIZ, Instituto Investigação da Floresta e Papel, Aveiro, pp. 351-358.
- BALLOU, J.D., LACY, R.C., 1995. Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed populations. In: *Population Management for Survival and Recovery* (ed. BALLOU J.D.), pp. 76-111. Columbia University Press.
- BLOUIN, M.S., 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 503-511.
- BLOUIN, M.S., PARSONS, M., LACAILLE, V., LOTZ, S., 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* **5**: 393-401.
- BORRALHO, N.M.G., ALMEIDA, M.H., POTTS, B.M., 2007. O melhoramento do eucalipto em Portugal. In: *O eucalipto em Portugal* (eds. ALVES A.M., PEREIRA J.S., SILVA J.M.N.), pp. 62-110. ISA Press, Lisbon.
- BRONDANI, R., BRONDANI, C., GRATTAPAGLIA, D., 2002. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. *Molecular Genetics and Genomics* **267**: 338-347.
- BRONDANI, R.P.V., BRONDANI, C., TARCHINI, R., GRATTAPAGLIA, D., 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 816-827.
- CSILLERY, K., JOHNSON, T., BERALDI, D., CLUTTON-BROCK, T., COLTMAN, D., HANSSON, B., SPONG, G., PEMBERTON, J.M., 2006. Performance of Marker-Based Relatedness Estimators in Natural Populations of Outbred Vertebrates. *Genetics* **173**: 2091-2101.
- JONES, R.C., STEANE, D.A., POTTS, B.M., VAILLANCOURT, R.E., 2002. Microsatellite and morphological analysis of *Eucalyptus globulus* populations. *Canadian Journal of Forest Research* **32**.
- JONES, T.H., STEANE, D.A., JONES, R.C., PILBEAM, D., VAILLANCOURT, R.E., POTTS, B.M., 2006. Effects of domestication on genetic diversity in *Eucalyptus globulus*. *Forest Ecology and Management* **234**: 78-84.
- LI, C.C., WEEKS, D.E., CHAKRAVARTI, A., 1993. Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. *Human Heredity* **43**: 45-52.
- LYNCH, M., RITLAND, K., 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* **152**: 1753-1766.
- MARQUES, C.M., ARAUJO, J.A., FERREIRA, J.G., WHETTEN, R., O'MALLEY, D.M., LIU, B.H., SEDEROFF, R., 1998. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theoretical and Applied Genetics* **96**: 727-737.
- QUELLER, D.C., GOODNIGHT, K.F., 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**: 258-275.
- RITLAND, K., 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetical Research* **67**: 175-185.
- RITLAND, K., TRAVIS, S., 2004. Inferences involving individual coefficients of relatedness and inbreeding in natural populations of Abies. *Forest Ecology and Management* **197**: 171-180.
- ROHLF, F.J., 1993. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (V 2.1.)* Exeter Publisher, New York.

- RUSSELLO, M.A., AMATO, G., 2004. Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology* **13**: 2829-2840.
- STEANE, D.A., VAILLANCOURT, R.E., RUSSEL, J., POWELL, W., MARSHALL, D., POTTS, B.M., 2001. Development of microsatellite loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Silvae Genetica* **50**: 89-91.
- THOMAS, S.C., 2005. The estimation of genetic relationships using molecular markers and their efficiency in estimating heritability in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**: 1457-1467.
- VAN DE CASTEELE, T., GALBUSERA, P., MATTHYSEN, E., 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology* **10**: 1539-1549.
- WANG, J., 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* **160**: 1203-1215.

Variação da Composição Química Dentro e Entre Famílias de *Pinus pinaster* Aiton na Mata Nacional do Escaroupim

Ana Alves^{1,2}, António Santos^{1,2}, Rita Simões¹, Maria João Gaspar³, José Luís Lousada³, Pedro Fevereiro⁴, Alexandre Aguiar⁵ e José Rodrigues¹

¹Instituto de Investigação Científica Tropical. Centro de Estudos de Tecnologia Florestal. Tapada da Ajuda, 1349-018 LISBOA

²UTL. Instituto Superior de Agronomia. Centro de Estudos Florestais. Tapada da Ajuda, 1349-017 LISBOA

³Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro. Centro de Estudos Florestais. Departamento Florestal, 5001-801 VILA REAL

⁴Instituto de Tecnologia Química e Biológica. Universidade Nova de Lisboa. Quinta do Marques, Av. da República, 2780-157 OEIRAS

⁵INRB. L-INIA. Unidade de Recursos Genéticos, Ecofisiologia e Melhoramento de Plantas. Quinta do Marquês, Av. da República, 2780-157 OEIRAS

Resumo. Em Portugal, a *Pinus pinaster* Aiton, é uma das mais importantes espécies ocupando cerca de 1.000.000 ha, sendo a principal fonte de fibra longa para a produção de pasta de papel.

A introdução de critérios de qualidade da madeira é um objectivo importante nos programas de melhoramento. A composição química é relevante sobretudo no caso em que a madeira se destina à produção de pasta para papel, no entanto o custo das análises tem inviabilizado a utilização deste parâmetro nos programas de melhoramento.

A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) permite a análise de um grande número de amostras com elevada fiabilidade e com custos muito inferiores aos dos métodos de referência tem permitido a inclusão de parâmetros de qualidade em programas de melhoramento.

Neste trabalho analisou-se o teor de extractivos e de lenhina por NIR num total de 184 árvores de 46 famílias (4 árvores por família).

O teor médio de extractivos foi de 1,7%, 1,2% e 3,2% respectivamente para diclorometano, etanol e água, verificando-se diferenças significativas entre famílias para os dois últimos solventes. O teor de lenhina médio obtido foi de 28,6%, tendo-se verificado diferenças significativas entre as famílias.

Introdução

O pinheiro bravo (*Pinus pinaster* Aiton) é uma espécie de elevada importância no sector florestal português, pois o aproveitamento industrial da sua madeira para serração, fabrico de aglomerados e produção de pasta para papel são actividades com um peso considerável na economia portuguesa. Em 2002, esta espécie contribuiu com 16,2% para o total de matéria-prima lenhosa usada no fabrico de 1927 milhares de toneladas de pasta para papel (CELPA, 2002).

A importância papeleira desta espécie e a crescente procura de madeira de elevada qualidade, com menor variabilidade das suas propriedades e maior rendimento, colocam uma grande pressão ao nível do desenvolvimento sustentável da floresta, que passa entre outros pelo melhoramento qualitativo do lenho. Neste sentido encontram-se a decorrer projectos europeus de melhoramento genético de pinheiro bravo, essencialmente orientados para a obtenção de matéria-prima de melhor qualidade para a indústria de pasta para papel.

O conhecimento da composição química da madeira é fundamental para a compreensão das suas propriedades, sobretudo nos casos em que ela se destina à transformação química para a produção de pasta para papel. Nesta intervêm não só os componentes estruturais das paredes celulares (a lenhina e os polissacáridos – celulose e hemiceluloses), mas também os materiais extractáveis, tanto do ponto de vista da sua composição estrutural, quanto dos respectivos teores (RODRIGUES, 1998).

Neste trabalho analisou-se o teor de extractivos e de lenhina por NIR num total de 184 árvores de 46 famílias (4 árvores por família).

Material e métodos

Preparação das amostras

As amostras (184 verrumas) provenientes da Mata Nacional de Escaroupim foram primeiramente moídas num moinho de facas da Retsch modelo SM 2000 com uma malha de saída de 1 mm e posteriormente num moinho ultra centrífugo da Retsch ZM100 com uma malha de saída de 0,5 mm.

Aliquotas de 2 gramas das amostras moídas com um diâmetro menor do que 0,5 mm foram extractadas sequencialmente em diclorometano, etanol e água. A extracção usou um processo desenvolvido no laboratório do Centro de Florestas e Produtos Florestais (IICT) que ocorre em duas fases, na 1ª fase as amostras são colocadas directamente em contacto com o solvente à temperatura de ebulição durante trinta minutos (percolação) em seguida são suspensas no condensador, acima do solvente em ebulição durante 60 minutos (extracção propriamente dita) de acordo com o método descrito por SOUSA-CORREIA *et al.* (2007).

Espectroscopia de infravermelho próximo (NIR)

Os espectros livre de extractivos foram adquiridos num espectrómetro de infravermelho próximo da marca Bruker modelo Vector 22 N/I com esfera de integração. Estes espectros foram obtidos por reflectância difusa entre 12 000 e os 4000 cm^{-1} e resultam da coadição de 100 varrimentos de leitura (scans) com uma resolução de 8 cm^{-1} . Os espectros das amostras extractadas, foram usados para determinar o teor de lenhina Klason, recorrendo a um modelo de calibração desenvolvido para esta espécie. O modelo de calibração foi construído com 46 amostras, apresentando um coeficiente de determinação de $R^2=0,96$ e um erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV) de 0,40%.

Resultados e discussão

O teor médio de extractivos e o respectivo desvio padrão obtido foi de $1,7\pm 1,5\%$; $1,2\pm 0,2\%$ e $3,2\pm 1,1\%$ respectivamente para o diclorometano, etanol e água, variando os valores entre um mínimo e máximo de 0,6-13%; 0,4-2,2%; 1,2-8,1% respectivamente. Verificaram-se diferenças significativas entre famílias apenas para os dois últimos solventes.

As figuras 1, 3 e 3 mostram a variação de extractivos entre as 46 famílias, verificando-se que existe maior variabilidade dentro das famílias, do que entre as famílias, verificou-se que

as famílias com elevados teores de extractivos, tinham pelo menos uma árvore com elevados teores de resina.

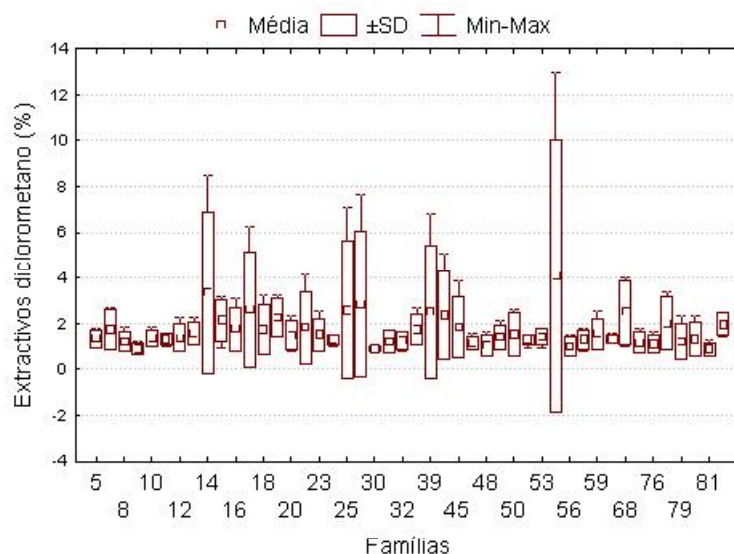


Figura 1 - Variação do teor de extractivos em diclorometano para as 46 famílias

Como se pode verificar a maior parte das famílias tem um baixo teor e baixa variabilidade no teor de extractivos em diclorometano.

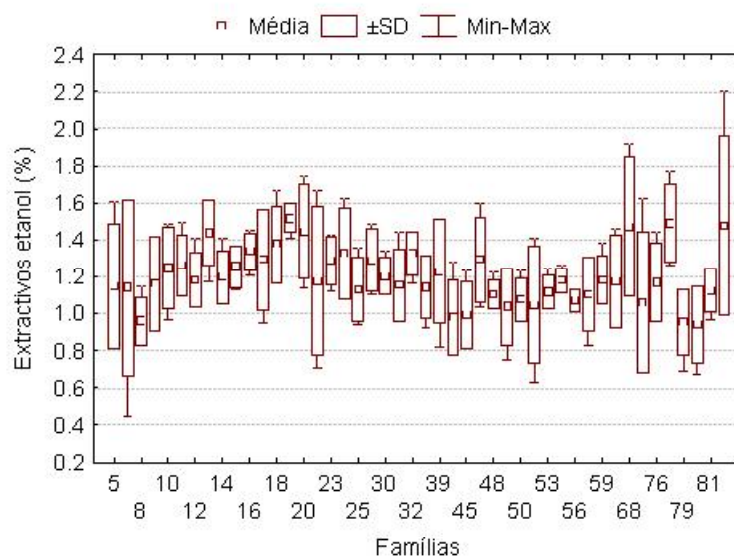


Figura 2 - Variação do teor de extractivos em etanol para as 46 famílias

O teor de extractivos em etanol variam pouco, quer entre quer dentro das famílias, embora também aqui a variabilidade dentro das famílias seja superior à variabilidade entre famílias. Para a maioria das amostras o teor de extractivos em água corresponde à maior fatia dos extractivos totais. Tal como se verificou nos casos anteriores também aqui a variação dentro das famílias é superior à variação entre famílias.

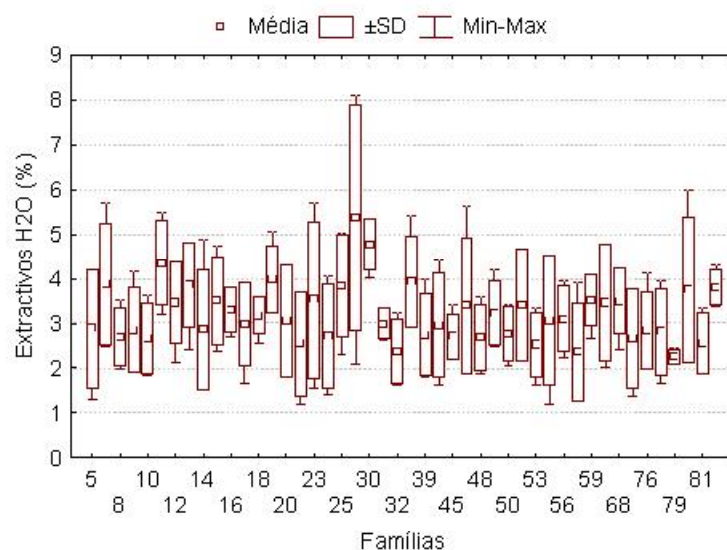


Figura 3 - Variação do teor de extractivos em água para as 46 famílias

O valor médio do teor de lenhina Klason (Figura 4) foi de 28,6%, oscilando os valores entre um mínimo de 26,8% e um máximo de 30,8%, tendo-se verificado diferenças significativas entre as famílias. Estes valores são em média 1% inferiores, em valor absoluto, aos encontrados por ALVES *et al.* 2006 para 46 amostras de *Pinus pinaster* provenientes de França, em que o valor médio encontrado foi de 29,7% oscilando os valores entre um máximo de 32,7% e um mínimo de 25,8%. O valor máximo do teor de lenhina das amostras portuguesas foi de 30,8% contra 32,7% no caso francês. Em parte estes resultados podem ser explicados pelo elevado número de amostras com lenho de reacção nas amostras provenientes de França. Também se verificou que a variabilidade das amostras (desvio padrão de 0,7%) é inferior à variabilidade encontrada nas amostras francesas (desvio padrão de 2,0%),

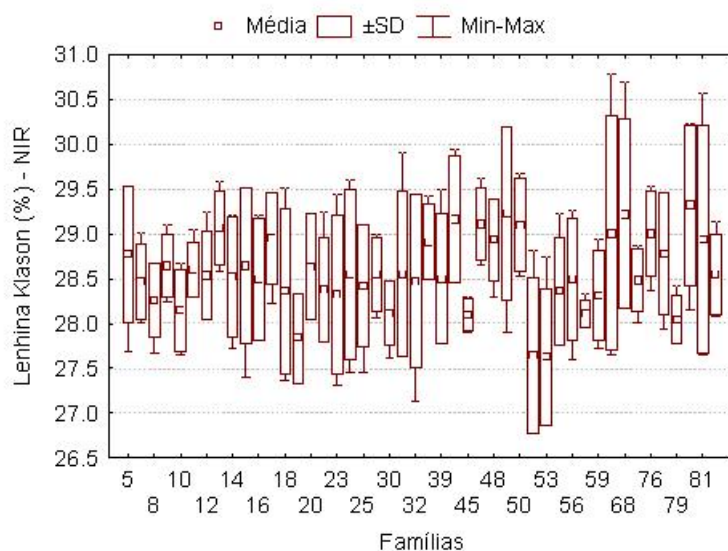


Figura 4 – Variação do teor de lenhina Klason para as 46 famílias, estimado por NIR

Conclusões

Os resultados obtidos permitiram verificar a existência de diferenças significativas entre famílias para o teor de extractivos em etanol, água e teor de lenhina. E de diferenças não significativas para o teor de extractivos em diclorometano.

Referências bibliográficas

- ALVES, A., SCHWANNINGE, R. M., PEREIRA, H., RODRIGUES, J., 2006. Analytical pyrolysis: A direct method to determine the lignin content in wood. Part 1: Comparison of Py-lignin with the Klason lignin method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **76**: 209-213.
- CELPA, 2002. Associação da Indústria Papeleira. Perfil Económico e Social da Indústria Papeleira.
- RODRIGUES, J.C.C., 1998. Caracterização da Composição Química da Madeira de *Eucalyptus globulus* Labill. por Espectroscopia de Infravermelho e Pirólise Analítica. Dissertação de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, pp. 9/33.
- SILVA-PEREZ, D., GUILLEMAIN, A., ALAZARD, P., PLOMION, C., ROZEMBERG, P., RODRIGUES, J., ALVES, A., CHANTRE, G., 2007. Improvement of *Pinus pinaster* wood elite trees selection by combining near infrared spectroscopy and genetic tools. *Holzforschung* **61**: 611-622.
- SOUSA-CORREIA, C., ALVES, A., RODRIGUES, J., FERREIRA-DIAS, S., ABREU, J.M., MAXTED, N., FORD-LLOYD, B., SCHWANNINGER, M., 2007. Oil content estimation of single kernel of *Quercus* sp. acorns by near infrared (NIR) spectroscopy and partial least squares regression (PLSR). *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **15**: 247-260.

Variabilidade Genética e Plasticidade Fenotípica de Caracteres Adaptativos em Pinheiro Bravo

Ricardo Alía¹, Majada J.², Feito I.², Chambel M.R.¹ e Climent J.¹

¹Centro de Investigación Forestal CIFOR-INIA. Departamento de Sistemas y Recursos Forestales. Ctra A Coruña Km 7,5. 28040 Madrid, ESPAÑA

²SERIDA. Planta Experimental "La Mata", Apdo 13, 33820 Grado, Asturias, ESPAÑA

Introdução

A *Pinus pinaster* é uma das espécies europeias com maior diversidade genética entre e dentro de populações, tanto em caracteres neutrais como em caracteres adaptativos (CORREIA *et al.*, 2004; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2004). Simultaneamente, constatou-se a existência de uma importante interacção genótipo x ambiente em características morfológicas e fisiológicas (ALIA *et al.*, 1997; CHAMBEL and ALÍA, 2002), o que implica diferenças em plasticidade fenotípica entre genótipos em sentido lato (proveniências e famílias). O papel adaptativo das diferenças em plasticidade fenotípica para o uso sustentável dos recursos genéticos desta espécie, num cenário de alteração climática é ainda mal conhecido. Em concreto, é extremamente interessante separar as respostas inevitáveis, como a redução do crescimento em condições limitantes, das que podem levar a que se mantenha a uma elevada produtividade em ambientes desfavoráveis (ALPERT and SIMMS 2002; CHAMBEL *et al.*, 2005). Entre estas últimas, a fenologia e o desenvolvimento das plantas (ontogenia) durante a fase de estabelecimento representam alguns dos mecanismos possíveis de adaptação ambiental (SCHLICHTING and PIGLIUCCI, 1998). Nas últimas décadas verificou-se um interesse crescente pela diferenciação genética e pela plasticidade da fenologia, como consequência da preocupação geral pelos efeitos do aumento das temperaturas a nível global e da sua interacção com os ritmos cíclicos das plantas (HURME *et al.*, 2000; LI and ADAMS 1993). Pelo contrário, em espécies florestais, ainda sabemos muito pouco sobre o papel que a ontogenia pode desempenhar na adequação ao ambiente experimentado pelas plantas nas primeiras etapas de vida, dos processos irreversíveis associados ao crescimento, com a excepção de alguns trabalhos publicados sobre *Eucalyptus* (JORDAN *et al.*, 2000) e sobre *Pinus canariensis* (CLIMENT *et al.*, 2006). Adicionalmente, trabalhos recentes mostraram diferenças em algumas características funcionais (transpiração cuticular e tolerância às geadas) entre as agulhas primárias e as secundárias, cuja sequência de formação segue um claro padrão ontogénico, em várias espécies de pinheiros mediterrâneos (CLIMENT *et al.*, 2009; PARDOS *et al.*, 2008). O objectivo deste trabalho é quantificar a variabilidade genética entre e dentro de proveniências e as diferenças em plasticidade fenotípica de caracteres de potencial interesse adaptativo, em concreto o crescimento em altura, a fenologia e o desenvolvimento do eixo principal.

Material e Métodos

Material vegetal

Neste estudo usaram-se 140 famílias de meios-irmãos de *Pinus pinaster*, procedentes de 12 populações naturais que cobrem a área de distribuição desta espécie (Tabela 1). Estes materiais plantaram-se em 2003 em dois locais de ensaio (Ibias, 6°53'W, 43°01'N, 773 m snm, P:1222 mm, T: 10,5°C; e Cavada: 6°32'W; 43°25'N, 468m snm, P: 1089, T: 11,9°C). Na plantação utilizou-se planta de um ano de idade e seguiu-se um desenho experimental em filas e colunas, com quatro plantas por família e repetição e quatro repetições por família

Tabela 1 - localização das proveniências incluídas no ensaio. Grupo 1: proveniências atlânticas, grupo 2: proveniências ibéricas mediterrâneas, grupo 3: proveniências do interior da Península Ibérica, grupo 4: proveniências do sudeste espanhol e norte de África; grupo 5: proveniências da Córsega

Grup.	Cód.	Longitude	Latitude	Nome	Município	Localização	País
1	Alto	05° 18' 00.16" W	43° 24' 41.29" N	Alto de la Llama	Alto de La Llama	Astúrias	ESP
3	Aren	05° 07' 13.00" W	40° 11' 19.00" N	Arenas	Arenas de San Pedro	Ávila	ESP
1	Arma	06° 24' 15.00" W	43° 19' 37.00" N	Armaysan	Tineo	Astúrias	ESP
3	Bayu	02° 55' 40.00" W	41° 32' 00.00" N	Bayubas	Bayubas	Sória	ESP
1	Cada	6° 22' 49.67" W	43° 32' 31.08" N	Cadavedo	Valdes	Astúrias	ESP
3	Carb	04° 15' 19.00" W	41° 10' 13.00" N	Carbonero	Carbonero el Mayor	Segóvia	ESP
1	Cast	07° 00' 10.33" W	43° 30' 27.64" N	Castropol	Castropol	Astúrias	ESP
3	Ceni	04° 30' 00.00" W	40° 17' 02.00" N	Cenicientos	Cenicientos	Madrid	ESP
3	Coca	04° 30' 11.00" W	41° 13' 52.00" N	Coca	Coca	Segóvia	ESP
1	Cont			Control	Control	Galiza	ESP
3	Cuel	04° 12' 24.00" W	41° 18' 48.00" N	Cuellar	Cuellas	Segóvia	ESP
1	Leir	08° 57' 27.00" W	39° 47' 00.00" N	Leiria	Leiria	Portugal	PT
1	Mimi	01° 18' 11.00" W	44° 08' 03.00" N	Mimizan	Mimizan	Landes	FR
4	Oria	02° 18' 51.00" W	37° 30' 54.00" N	Oria	Oria	Almeria	ESP
5	Pini	09° 27' 53.00" E	42° 01' 16.00" N	Pinia	Pinia	Córsega	FR
5	Pine	09° 00' 14.00" W	41° 57' 32.00" N	Pineta	Pineta	Córsega	FR
1	Pleu	02° 20' 37.00" W	47° 46' 52.00" N	Pleucadec	Pleucadec	Landes	FR
1	Puer	06° 37' 25.00" W	43° 32' 55.00" N	Puerto de Vega	Navia	Astúrias	ESP
1	Rodo	06° 25' 36.00" W	43° 19' 19.00" N	Rodoiros	Tineo	Astúrias	ESP
1	San	08° 21' 52.00"	42° 07' 06.00"	San Cipriano	As Neves	Pontevedra	ESP
3	SanL	03° 05' 10.00"	41° 50' 39.00"	San Leonardo	San Leonardo	Sória	ESP
1	Segu	08° 27' 00.00"	42° 49' 00.00"	Sergude	Boqueixon	Corunha	ESP
2	Sier	00° 53' 60.00"	41° 09' 60.00"	Sierra de Pradell	Sierra de Pradell	Tarragona	ESP
4	Tamr	05° 00' 00.00"	34° 00' 00.00"	Tamrabta	Tamrabta	Marrocos	MAR
3	Vald	04° 18' 00.00"	40° 31' 60.00"	Valdemaqueda	Valdemaqueda	Madrid	ESP
1	Lamu	06° 12' 03.00"	43° 34' 09.00"	Lamuño	Cudillero	Astúrias	ESP

Os resultados apresentados referem-se a (ontogenia) alturas três, quatro e seis anos após a plantação, fenologia e estado de desenvolvimento do ramo terminal quatro anos após a plantação. A fenologia foi avaliada com uma escala subjectiva com seis níveis:

1. Gema terminal dormente.
2. Gema terminal abrolhada, sem gemas axilares visíveis.
3. Distinguem-se as gemas dos braquiblastos (na base o em toda a longitude da gema).
4. Distinguem-se as pontas das agulhas secundárias, saindo das gemas dos braquiblastos.
5. Vêm-se claramente as agulhas secundárias.
6. Agulhas secundárias totalmente desenvolvidas.

O estado de desenvolvimento do ramo terminal (ontogenia) foi avaliado com uma escala de três valores:

1. Juvenil, só com agulhas primárias e sem gema terminal.
2. Intermédio, braquiblastos com agulhas secundárias nas axilas de algumas das agulhas primárias, sem gema terminal.
3. Adulto, gema terminal que dá lugar a um ramo terminal com agulhas secundárias.

Análise dos dados

Para a análise dos dados aplicou-se uma análise de variância com um modelo misto (SAS, 1989), considerando aleatório o efeito da família (hierarquizada dentro da proveniência). Calculou-se a heritabilidade para cada carácter estudado, depois de ter eliminado o efeito da proveniência, o que permite obter uma estimacão global deste parâmetro. Considerou-se que a probabilidade da amostra aleatória de sementes utilizada para a produçãõ incluir casos de irmãos completos é mínima, pelo que se considerou $V_a = 4 \times V_{fam}$.

A diferenciação genética para os caracteres quantitativos (Q_{st}) foi calculada a partir de estimacões da variância entre e dentro de populações obtidas pelos métodos habituais (SPITZE, 1993; WEIR and COCKERHAM, 1984; WRIGHT, 1951).

$$Q_{ST} = \frac{V_{pop}}{V_{pop} + 2(V_A)}$$

Resultados e Discussão

A evoluçãõ do crescimento das plantas desde a plantaçãõ até à última mediçãõ mostra claramente as acusadas diferenças entre os dois locais de ensaio (Figura 1). A altura média das plantas em Cavada em 2009 superava já o dobro da registada em Ibias.

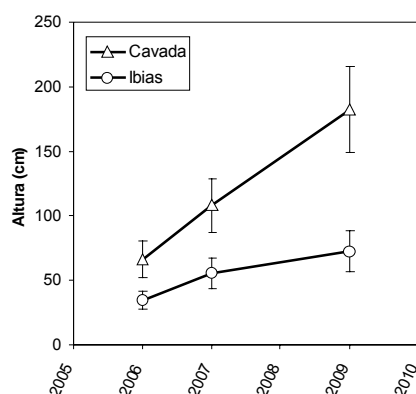


Figura 1 - Crescimento em altura das plantas de *P. pinaster* nos dois locais de ensaio.

Interacção proveniência x local

Tanto o local de ensaio como a proveniência e a sua interacção foram estatisticamente significativos para todas as variáveis analisadas. No entanto, para a altura aos 6 anos (H09), esta interacção é sobretudo quantitativa, já que todas as proveniências cresceram mais no local mais favorável (Cavada) e que as proveniências com melhor e pior crescimento tendem a coincidir em ambos locais. Esta elevada plasticidade no crescimento parece ser uma característica geral da espécie (CHAMBEL, 2006; CHAMBEL and ALÍA, 2002), e neste caso chama a atenção devido à escassa distância geográfica que separa os dois locais de ensaio. Em conjunto, os resultados mostram uma superioridade quanto a crescimento das proveniências atlânticas, em comparação com as do interior da Península Ibérica e as africanas, o que está de acordo com os resultados obtidos noutros estudos (ALÍA *et al.*, 1995; ALIA *et al.*, 1997), se bem que neste caso se observa uma grande heterogeneidade de comportamento das proveniências do grupo atlântico.

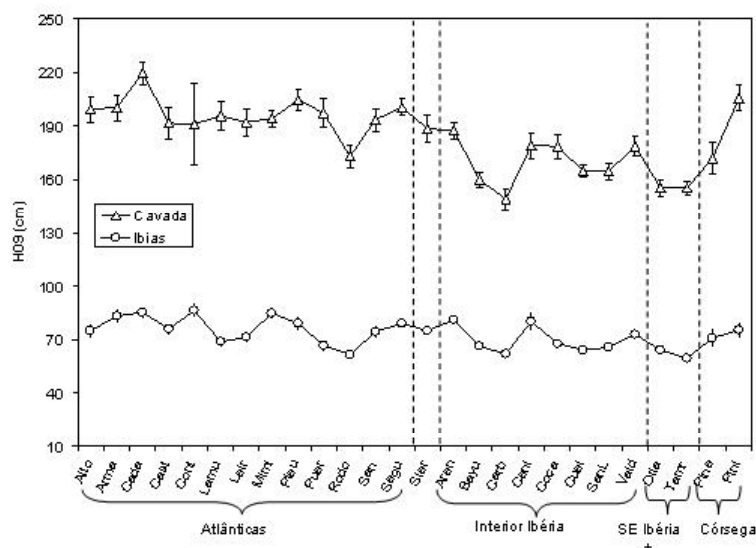


Figura 2 - Interacção proveniência x local para a altura aos seis anos de idade (H09). A ordenação das proveniências corresponde a grupos geográficos

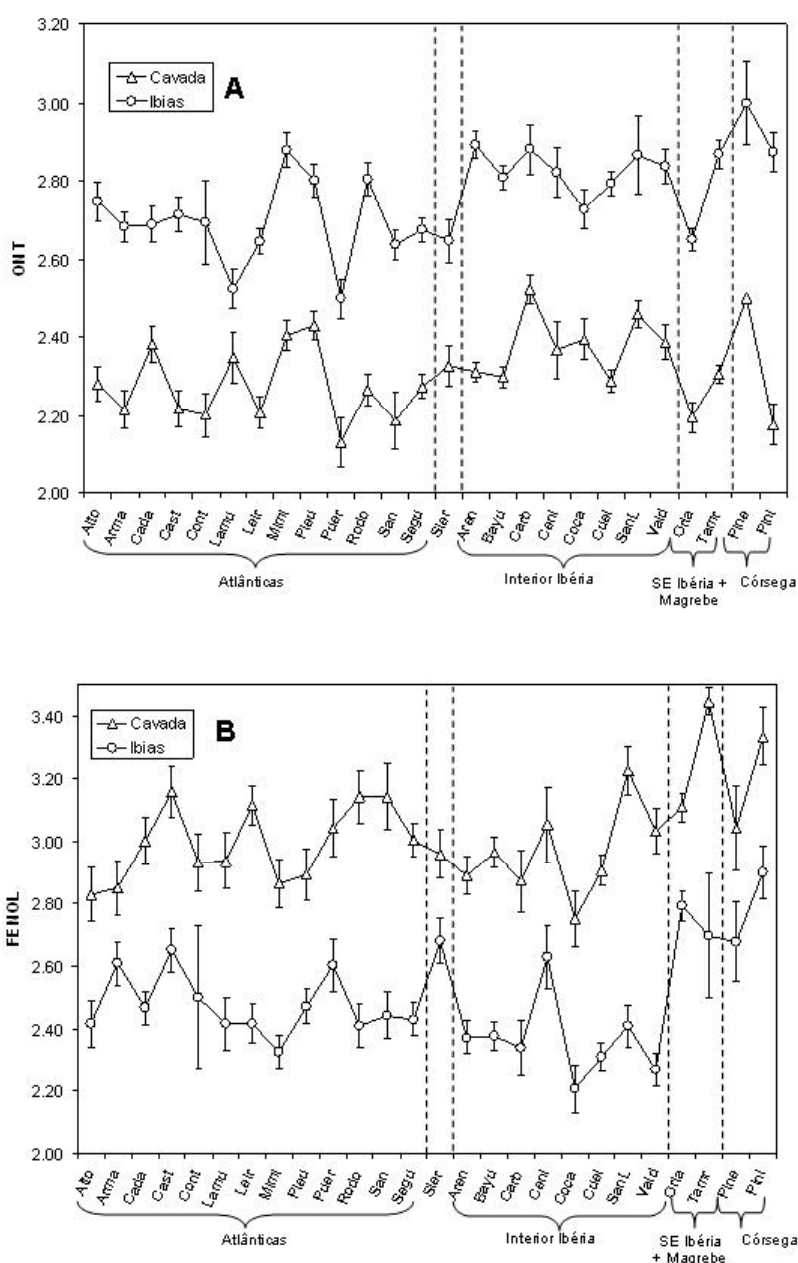


Figura 3 - Interação proveniência x local para a Ontogenia (A) e a Fenologia (B) aos quatro anos de idade. A ordenação das proveniências corresponde a grupos geográficos

A interação observada tanto para a Ontogenia como para a Fenologia foi muito mais complexa, no local mais favorável (Cavada), a fenologia adiantou-se, mas o estado de desenvolvimento do ramo principal foi mais atrasado (maior número de plantas com um padrão de crescimento juvenil, com poucas agulhas adultas e menor proporção de plantas com gema terminal). Este adiantamento da ontogenia em condições menos favoráveis contrasta com o que se observou num ensaio de proveniências de *Pinus canariensis* (CLIMENT *et al.*, 2006). A discordância entre o comportamento observado nestas duas espécies pode dever-se a um efeito das baixas temperaturas de Ibias, enquanto que no

ensaio de *Pinus canariensis* os dois locais estudados apenas diferiam em relação à disponibilidade hídrica.

A diferenciação entre proveniências para a Ontogenia apresenta um claro padrão geográfico. As proveniências atlânticas ibéricas e as africanas mostraram um menor grau de desenvolvimento que as do interior da península Ibérica e as proveniências atlânticas mais setentrionais (*Mimi*, *Mimizan*, y *Pleu*, *Pleucadec*). Este padrão poderia sugerir uma adaptação ao frio nas primeiras etapas de crescimento mediante a formação precoce de uma gema terminal e/o de agulhas adultas, embora a maior susceptibilidade das agulhas primárias relativamente às secundárias constatada noutras espécies de pinheiros mediterrâneos não esteja muito clara para o pinheiro bravo (CLIMENT *et al.*, 2009b).

O padrão de variação da Fenologia não parece tão claro, no local mais seco e frio (Ibias) verifica-se uma estruturação geográfica mais clara para a fenologia. Concretamente, destacam pelo seu atraso fenológico (abrolhamento tardio) as proveniências do interior da península Ibérica (com excepção de *Cen*, *Cenicientos*, na província de Madrid, uma zona bastante quente), por oposição às proveniências africanas e às da Córsega. De novo neste caso, as proveniências atlânticas mostram respostas muito heterogêneas.

Heritabilidade e diferenciação genética

As heritabilidades para as alturas foram moderadamente elevadas e muito semelhantes entre locais de ensaio, apesar das notáveis diferenças de crescimento observadas. Além disso, as heritabilidades aumentaram com o tempo em ambos locais, durante o período de estudo (Tabela 2). Os coeficientes de diferenciação entre proveniências (Q_{ST}) para altura foram moderadamente baixos, algo maiores no local menos favorável, Ibias. Com excepção da altura aos quatro anos em Ibias, esta diferenciação não é muito superior à média observada mediante marcadores moleculares (0,07) (EVENO *et al.*, 2008).

Tabela 2 - Heritabilidades e coeficientes de diferenciação genética para as variáveis estudadas

Variable	Parametro	Conjunto	Cavada	Ibias
H06	Q_{ST}	0,106	0,097	0,165
	H^2	0,270	0,366	0,322
H07	Q_{ST}	0,073	0,074	0,094
	H^2	0,301	0,418	0,363
H09	Q_{ST}	0,057	0,078	0,065
	H^2	0,343	0,471	0,422
ONT	Q_{ST}	0,103	0,125	0,092
	H^2	0,135	0,118	0,245
FENOL	Q_{ST}	0,056	0,037	0,040
	h^2	0,208	0,198	0,383

As heritabilidades para a Ontogenia e a Fenologia foram superiores e os coeficientes de diferenciação entre proveniências inferiores no local menos favorável, Ibias. De qualquer forma, os valores de Q_{ST} para estas variáveis são de uma magnitude semelhante à observada para as variáveis de crescimento.

Implicações para a conservação e o uso dos recursos genéticos

Os resultados apresentados indicam a existência de padrões de variação genética e da plasticidade fenotípica entre os caracteres estudados. Apesar de se terem encontrado valores semelhantes de heritabilidades e Qst para crescimento, ontogenia e fenologia, os gráficos de interacção proveniência x local mostram em alguns casos padrões interessantes de variação geográfica que poderia ser um reflexo de processos de adaptação local. Estes são aspectos fundamentais para a *Estratégia Espanhola de Conservação e Uso Sustentável dos Recursos Genéticos Florestais* recentemente aprovada (MIMAM 2006). A análise conjunta dos caracteres relacionados tanto com a produção como com a adaptação ao ambiente permitirá otimizar o uso da variação entre e dentro de proveniências para desenhar programas mais eficientes de conservação e melhoramento de *Pinus pinaster* a nível nacional e internacional.

Agradecimentos

O ensaio utilizado neste estudo foi realizado com financiamento da Direcção Geral da Biodiversidade através de uma convenção com o INIA (CC03-048) e pelo projecto Treesnips (EU) e as medições e análises foram realizadas com a co-participação dos projectos Noveltree (EU, VII FP) e o projecto Restaura (MICINN. PSS-310000-2008-4).

Referências

- ALÍA, R., GIL, L., PARDOS, J.A., 1995. Performance of 43 *Pinus pinaster* Ait. Provenances on 5 locations in central Spain. *Silvae Genetica* **44**:75-81.
- ALIA, R., MORO, J., DENIS, J.B., 1997. Performance of *Pinus pinaster* provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. *Canadian Journal of Forest Research* **27**:1548-1559.
- ALPERT, P., SIMMS, E.L., 2002. The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology* **16**: 285-297.
- CHAMBEL, M.R., 2006. Variabilidad adaptativa y plasticidad fenotípica en procedencias de pinos ibéricos. Tesis Doctoral. Dep. Silvopascicultura. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid. 118 p.
- CHAMBEL, M.R., ALÍA, R., 2002. Phenotypic plasticity in mediterranean pines (*Pinus pinaster*, *Pinus halepensis* and *Pinus nigra*). En Medpine2- International meeting on Mediterranean pines, Chania (Greece).
- CHAMBEL, M.R., CLIMENT, J., ALÍA, R., VALLADARES, F., 2005. Phenotypic plasticity: a useful framework for understanding adaptation in forest species. *Investigacion Agraria, Sistemas y Recursos Forestales*. **14**: 334-344.
- CLIMENT, J., CHAMBEL, M.R., LÓPEZ, R., MUTKE, S., ALÍA, R., GIL, L., 2006. Population divergence for heteroblasty in the Canary Islands pine (*Pinus canariensis*, Pinaceae). *American Journal of Botany* **93**: 840-848.
- CLIMENT, J., COSTA E SILVA, F., CHAMBEL, M.R., PARDOS, M., ALMEIDA, H., 2009. Freezing injury in primary and secondary needles of Mediterranean pine species of contrasting ecological niches. *Annals of Forest Science* DOI: 10.1051/forest/2009016
- CORREIA, I., ALMEIDA, H., AGUIAR, A., 2004. Variability of growth and form of 8 years provenances of *Pinus pinaster* in Mata Nacional do Escaroupim [Portugal]. *Silva Lusitana* **12**: 151-182.

- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S., MARIETTE, S., RIBEIRO, M., BURBAN, C., RAFFIN, A., CHAMBEL, M.R., RIBEIRO, C.A., AGUIAR, A., PLOMION, C., ALÍA, R., GIL, L., VENDRAMIN, G., KREMER, A., 2004. Genetic resources in maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton): molecular and quantitative measures of genetic variation and differentiation among maternal lineages. *Forest Ecology and Management* **197**: 103-115.
- HURME, P., SILLANPÄÄ, M., REPO, T., ARJAS, E., SAVOLAINEN, O., 2000. Genetic basis of climatic adaptation in Scots pine by Bayesian QTL analysis. *Genetics* **156**: 1309-1322.
- JORDAN, G.J., POTTS, B.M., CHALMERS, P., WILTSHIRE, R.J.E., 2000. Quantitative genetic evidence that the timing of vegetative phase change in *Eucalyptus globulus* ssp *globulus* is an adaptive trait. *Australian Journal of Botany* **48**: 561-567.
- LI, P., ADAMS, W., 1993. Genetic control of bud phenology in pole-size trees and seedlings of coastal Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research* **23**: 1043-1051.
- PARDOS, M., CALAMA, R., CLIMENT, J., 2008. Difference in cuticular transpiration and sclerophylly in juvenile and adult pine needles relates to the species-specific rates of development. *Trees: Structure and Function* DOI : 10.1007/s00468-008-0296-6.
- SCHLICHTING, C.D., PIGLIUCCI, M., 1998. Phenotypic evolution - A reaction norm perspective. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 387 p.
- SPITZE, K., 1993. Population Structure in *Daphnia obtusa*: Quantitative Genetic and Allozymic Variation. *Genetics* **135**: 367-374.
- WEIR, B.S., COCKERHAM, C.C., 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- WRIGHT, S., 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen* **1**: 323-334.

Comparação da Tolerância ao Frio entre Proveniências de Pinheiro Bravo Mediante Simulação de Geadas

Chambel, M.R., Ballesteros E., Pardos, M. e Climent J.

Centro de Investigación Forestal CIFOR-INIA. Departamento de Sistemas y Recursos Forestales.
Ctra A Coruña Km 7,5. 28040 Madrid, ESPAÑA

Introdução

A diferente susceptibilidade das distintas proveniências de *Pinus pinaster* às baixas temperaturas, constatada tanto em plantações comerciais como em ensaios de campo vem suscitando interesse desde há longo tempo. A grande amplitude ecológica desta espécie e a elevada variação entre proveniências encontrada para diversos caracteres adaptativos (AGUIAR *et al.*, 2003; ALIA *et al.*, 1997; CORREIA *et al.*, 2004; HARFOUCHE *et al.*, 1995) justifica também a existência de uma ampla variação no que respeita à tolerância às geadas. No entanto até à data a informação experimental sobre a diferenciação genética intra-específica na tolerância ao frio desta espécie é escassa, o que não impediu a criação por parte da EU de legislação restritiva da exportação de Materiais Florestais *Pinus pinaster* de origem Ibérica, baseada no insucesso de algumas introduções levadas a cabo no passado. Um estudo recente constatou, para uma proveniência continental espanhola, uma tolerância de tecidos foliares semelhante à observada em espécies claramente tolerantes como *Pinus nigra* e *Pinus sylvestris*, e claramente superior à de outras espécies mediterrâneas como *P. pinea*, ou *P. halepensis* (CLIMENT *et al.*, 2009).

Com o objectivo de determinar a tolerância ao frio de algumas populações espanholas com potencial interesse comercial, iniciou-se uma linha de estudo baseada na simulação de geadas em ambiente controlado.

Material e métodos

Material vegetal

Para este estudo foram utilizadas plantas de nove proveniências espanholas de *Pinus pinaster*, pertencentes, cada uma delas, a uma região de proveniência distinta e com climas marcadamente diferentes, especialmente no que respeita às temperaturas mínimas (Tabela 1; Figura 1). Incluíram-se neste estudo tanto populações com grandes áreas e elevado número de indivíduos (regiões de proveniência designadas por um número), como populações consideradas marginais e/ou ameaçadas pelas suas reduzidas dimensões (regiões de proveniência designadas com uma letra), de maneira a cobrir toda a área ocupada por esta espécie em território espanhol com excepção da Galiza.

Tabela 1 - Lista das proveniências utilizadas no ensaio e principais variáveis climáticas. Alt = Altitude; Prec = precipitação média anual; Tmed = temperatura média anual; Tmax= média das temperaturas máximas do mês mais quente; Tmin= média das temperaturas mínimas do mês mais frio. As regiões de proveniência designadas por uma letra são regiões de área restrita

Cód.	Proveniência	Região de Proveniência segundo ALÍA <i>et al.</i> (1996)	Alt. (m)	Prec. (mm)	Tmed (°C)	Tmax (°C)	Tmin (°C)
6	Puig / Teixeta	B (Sierra de Pradel)	500	695	13,9	28,3	3,1
8	Fuencaliente	E (Fuencaliente)	905	741	14,2	34,9	0,1
9	Joalgazar	G (Serrania de Ronda)	470	1149	15,0	29,0	5,6
11	Talayuela	5 (Bajo Tiétar)	275	987	15,2	33,6	2,2
23	Oria	F (Sierra de Oria)	1342	445	12,7	30,1	0,2
25	Gredos	6 (Sierra de Gredos)	840	1456	12,4	31,1	1,0
26	Tabuyo	2 (Sierra del Teleno)	1010	750	9,9	26,7	-1,8
28	Cuellar	8 (Meseta Castellana)	756	464	12,2	31,1	-0,6
29	Quatretonda	D (La Sabor)	421	777	15,3	30,3	3,4

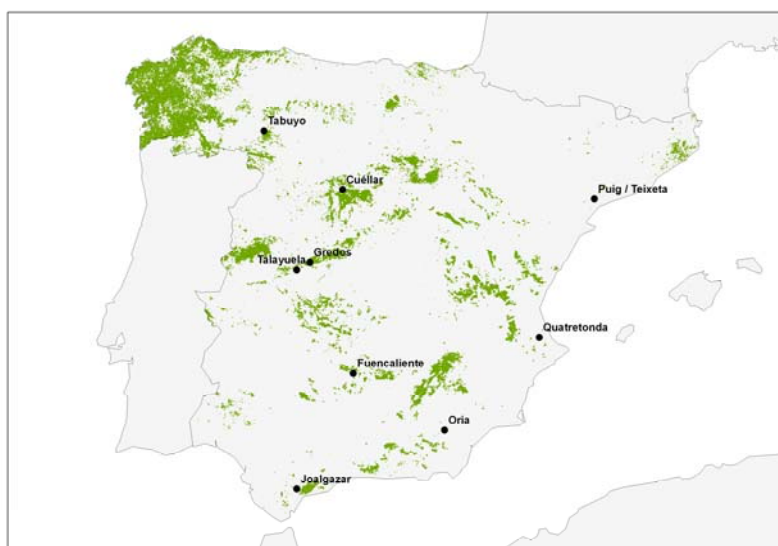


Figura 1 - Localização das proveniências utilizadas no ensaio. A verde está assinalada a distribuição da espécie *Pinus pinaster* em território espanhol

De cada proveniência, foram utilizadas dez plantas com quatro anos de idade. Estas plantas foram semeadas nos viveiros da empresa TRAGSA em Maceda (Orense, Galiza), em contentores de 2 litros com substrato de turfa e areia e mantidas em estufa durante o primeiro inverno. Aos 30 meses foram transplantadas para contentores de 7 litros e mantidas ao ar livre durante o verão e o princípio do Outono. Em Outubro de 2008, antes da primeira geada, foram transferidas para Madrid, para a estufa do Instituto Nacional de Investigação Agrária, onde se mantiveram durante todo o ensaio, para evitar o efeito não controlado das geadas que ocorrem com frequência nesta zona.

Ensaio de frio

O efeito das baixas temperaturas foi avaliado em duas datas, no início de Dezembro, altura em que se supõe que as plantas devem apresentar o máximo nível de tolerância às baixas temperaturas, e em Abril, após o abrolhamento. Devido à falta de material vegetal, nesta segunda data só foi possível avaliar a resposta em seis proveniências (foram excluídas as proveniências 6, 9 e 28). Submeteram-se amostras de tecido foliar a um ciclo de geadas simuladas numa câmara que permite não só controlar a temperatura em cada momento como também a velocidade de descida (DICOMETAL). Utilizaram-se fragmentos de agulhas com dois centímetros de comprimento, cortados em ambos os extremos (BURR *et al.*, 1990). Tendo em conta que a distinta morfologia das agulhas juvenis e adultas de esta espécie influencia fortemente a resposta às baixas temperaturas (CLIMENT *et al.*, 2009), utilizaram-se apenas agulhas adultas e totalmente desenvolvidas. Uma vez cortados, estes segmentos foram lavados com água destilada e três segmentos por planta de cada procedência foram colocados em papel folhas de filtro humedecido também com água destilada, espetados em ranhuras com um centímetro de separação para evitar que os fragmentos se tocassem. O papel foi então dobrado em três partes, de forma a que as agulhas ficassem no interior e cada um destes embrulhos foi envolvido em papel de alumínio, para facilitar a condução da temperatura (Figura 2). Foi utilizado um embrulho destes, com um total de 30 fragmentos, para cada proveniência e temperatura de teste.



Figura 2 - Exemplo do tipo de embrulhos de papel de filtro e alumínio usados para os testes de frio. No presente estudo cada pacote continha 30 segmentos, pertencentes a 10 plantas da mesma temperatura

Uma vez colocados todos os embrulhos no interior da câmara, partindo de uma temperatura inicial de 4°C, procedeu-se a uma descida progressiva da temperatura, com uma velocidade controlada de 5°C/hora (GLERUM, 1985) até atingir a temperatura de teste mais alta, mantendo-se esta temperatura estável durante uma hora, finda a qual se retirava um embrulho de cada proveniência. A descida da temperatura prosseguia então ao mesmo ritmo até à segunda temperatura de teste, manteve-se a temperatura estável durante uma hora, retirou-se uma segunda amostra de cada proveniência (e.g. ANEKONDA *et al.*, 2000), e assim sucessivamente. As temperaturas de teste variaram de uma data para a outra, em função da resposta esperada; em Dezembro as temperaturas de teste variaram entre os -10°C e os -40°C, com intervalos de 5°C e em Abril variaram entre os -7°C e os -16°C, com intervalos de 3°C. Para o cálculo do efeito das baixas temperaturas sobre os tecidos foliares utilizou-se o índice de condutividade relativa (I_t) desenvolvido por FLINT (1967), para o

qual é necessário determinar a condutividade de cada amostra após a exposição às baixas temperaturas e a condutividade máxima após a morte dos tecidos. É necessária ainda uma amostra controle, que neste caso se manteve numa câmara frigorífica a 4°C durante todo o ciclo de geada para ser utilizada como controlo. Para as medições de condutividade, uma vez retiradas da câmara, as amostras deixaram-se descongelar lentamente a 4°C, e foram então passadas para tubos de ensaio com 20 cm³ de água destilada; deixaram-se incubar às escuras durante 20 horas a 20°C, após o que se fez a primeira medição de condutividade em cada amostra. Para provocar a morte completa dos tecidos, as amostras meteram-se numa estufa a 90°C durante duas horas, após o que passaram por um novo período de incubação de 20 horas, em condições idênticas, após o que se procedeu à medição da condutividade final de cada amostra.

Análise de dados

Utilizaram-se métodos baseados em estimações de máxima verosimilhança para ajustar um modelo de regressão logística para cada proveniência y data, utilizando os valores individuais de cada combinação temperatura - It. A partir destes modelos obtiveram-se os valores de temperatura que correspondem a um It de 50%, ou seja, à mortalidade de 50% dos tecidos foliares (LT₅₀, correspondente ao ponto de inflexão da curva logística). Este valor foi utilizado como um estimador da tolerância às baixas temperaturas de cada proveniência e em cada data. Além dos valores médios de LT₅₀, determinaram-se também os correspondentes intervalos de confiança a 95%.

Resultados

No ensaio realizado em Dezembro, verificou-se que todas as proveniências estudadas apresentam uma elevada tolerância ao frio, com valores de LT₅₀ oscilando entre -22,2°C para a proveniência 26 (Tabuyo, Sierra del Teleno, León) e os -26,9°C para a proveniência 23 (Oria, Sierra de Oria, Almería), sendo as diferenças entre proveniências não significativas (Figura 3). Os valores obtidos de LT₅₀ não se correlacionam com as temperaturas mínimas de origem, mas são em todos os casos muito inferiores às mínimas absolutas registadas nos locais de recolha da semente.

Tal como era de esperar, a tolerância às baixas temperaturas observada no ensaio realizado em Abril é muito inferior à de Dezembro, oscilando entre os -7,9°C da proveniência 26 (Tabuyo, Sierra del Teleno, León) e os -10,9°C da proveniência 11 (Talayuela, Bajo Tiétar, Cáceres). No entanto, neste caso o ajuste dos modelos logísticos foi, em geral, de muito pior qualidade porque as temperaturas aplicadas foram demasiado baixas, obtendo-se em todos os casos unicamente percentagens muito altas de tecidos afectados, o que não permite uma boa determinação dos pontos de inflexão e dos correspondentes intervalos de confiança devido ao desequilíbrio da nuvem de pontos. Por este motivo, torna-se necessário repetir estas determinações, utilizando uma maior gama de temperaturas. Precisamente, uma das dificuldades que apresenta este tipo de trabalhos é a adequação das temperaturas utilizadas em cada momento ao ritmo de aclimação e desaclimação de cada população, uma vez que não dispomos de valores de referência. Adicionalmente, com este ensaio não se cobriu o período crítico do Outono, em que as primeiras geadas podem provocar importantes

perdas se as plantas ainda não estiverem suficientemente aclimatadas. Por estes motivos, é necessário continuar com esta linha de trabalho.

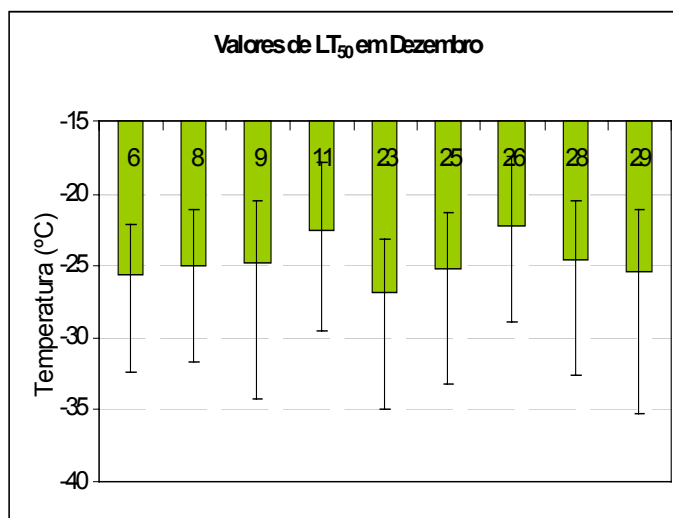


Figura 3 - Valores médios de LT₅₀ e intervalos de confiança a 95% obtidos em de Dezembro

Conclusões

Embora os resultados obtidos até ao momento sejam preliminares, parecem indicar que as nove populações estudadas apresentam uma elevada tolerância às baixas temperaturas no inverno, com menores diferenças entre proveniências do que seria de esperar, tendo em conta a variação existente quanto às suas condições de origem. É especialmente notável que entre as populações com maior tolerância nesta altura do ano se encontrem duas populações do litoral da Catalunha e de Valência, zonas com temperaturas mínimas bastante altas, enquanto a proveniência mais susceptível é precisamente a da Serra do Teleno (Tabuyo), que tem a temperatura mínima mais baixa entre as estudadas.

Agradecimentos

Este trabalho realizou-se no âmbito do projecto INIA AT07-002. As sementes utilizadas foram cedidas pela Direcção Geral da Biodiversidade.

Bibliografia

- AGUIAR, A., ALMEIDA, M., BORRALHO, N., 2003. Genetic control of growth, wood density and stem characteristics of *Pinus pinaster* in Portugal. *Silva Lusitana* **11**(2): 131-139.
- ALÍA, R., MARTÍN, S., DE MIGUEL, J., GALERA, R.M., AGÚNDEZ, D., GORDO, J., SALVADOR, L.C.G., GIL, L., 1996. Las regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Aiton en España. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- ALIA, R., MORO, J., DENIS, J.B., 1997. Performance of *Pinus pinaster* provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. *Canadian Journal of Forest Research* **27**(10): 1548-1559.

- ANEKONDA, T.S., ADAMS, W.T., AITKEN, S.N., NEALE, D.B., JERMSTAD, K.D., WHEELER, N.C., 2000. Genetics of cold hardiness in a cloned full-sib family of coastal Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research* **30**(5): 837-840.
- BURR, K.E., TINUS, R.W., WALLNER, S.J., KING, R.M., 1990. Comparison of three cold hardiness tests for conifer seedlings. *Tree Physiology* **6**: 351-369.
- CLIMENT, J., COSTA E SILVA, F., CHAMBEL, M.R., PARDOS, M., ALMEIDA, M.H., 2009. Freezing injury in primary and secondary needles of Mediterranean pine species of contrasting ecological niches. *Annals of Forest Science* **66**(4): 407-415.
- CORREIA, I., ALMEIDA, H., AGUIAR, A., 2004. Variability of growth and form of 8 years provenances of *Pinus pinaster* in Mata Nacional do Escaroupim [Portugal]. *Silva Lusitana* **12**(2): 151-182.
- FLINT, H., BOYCE, B., BEATTIE, D., 1967. Index of injury-a useful expression of freezing injury to plant tissues as determined by the electrolytic method. *Canadian Journal of Plant Science* **47**: 229-230.
- GLERUM, C., 1985. Frost hardiness of coniferous seedlings: principals and applications. In *Evaluating seedling quality: principles, procedures and predictive abilities of major tests*. Edited by M.L. Duryea. Oregon State University, Forest Research Laboratory. pp. 107-123.
- HARFOUCHE, A., BARADAT, P., DUREL, C.E., 1995. Intraspecific variability in maritime pine (*Pinus pinaster*) in the south-east of France. I. Variability in autochthonous populations and in the whole range of species. *Annales des Sciences Forestieres* **52**(4): 307-328.

*Ensaaios Genéticos de *Cryptomeria japonica* nos Açores*

J. Belerique¹, C. Nobrega¹, L. Penacho¹, I. Correia¹, C. Moutinho¹, J. Costa¹, E. Silva¹, M. Quintela¹, C. Faria² e M. H. Almeida²

¹ Direcção Regional dos Recursos Florestais. Rua do Contador, n.º 23, 9500-0503 Ponta Delgada, AÇORES

²UTL. Instituto Superior de Agronomia. Departamentode Engenharia. Florestal. Tapada da Ajuda, 1349-017 LISBOA

Resumo. A *Cryptomeria japonica*, é actualmente a espécie mais representativa da floresta de produção dos Açores e o esteio da fileira florestal local. Foi introduzida na Ilha de S. Miguel, em meados do século XIX, tendo-se expandido rapidamente por todo o território Açoriano, como consequência da excelente adaptação às condições locais, principalmente as de média altitude, e dos rápidos crescimentos que a espécie exhibe.

O lugar proeminente que actualmente ocupa no sector florestal da Região Autónoma dos Açores e a necessidade de uma utilização mais racional e produtiva, motivaram que no âmbito do Programa de Melhoramento Florestal dos Açores fosse criada uma linha de acção de melhoramento genético desta espécie, com o objectivo de aumentar a produtividade e melhorar a sanidade dos seus povoamentos assim como melhorar a qualidade da matéria prima produzida.

Em 2002, iniciou-se o estabelecimento de uma rede de ensaios genéticos com o objectivo de avaliar a variabilidade da população portuguesa, comparar o seu comportamento com o das proveniências da área de origem e de regiões em que é exótica e a existência de interacção genótipo x ambiente, através da avaliação da sobrevivência e do crescimento.

Neste trabalho é reunida a informação recolhida nos ensaios de proveniências e de descendência e efectuada uma avaliação da estabilidade temporal e espacial dos resultados obtidos nos primeiros anos.

Palavras-chave: *Cryptomeria japonica*, ensaios de proveniências e de descendência

Novas Perspectivas para o Melhoramento Genético do Eucalipto em Portugal

Gabriel Dehon Rezende, José Alexandre Araújo e Serafim Tavares

RAIZ - Instituto de Investigação da Floresta e do Papel. Quinta de S. Francisco, Apartado 15,
3801-501 EIXO

Historial

O RAIZ assumiu em 1996 os programas de melhoramento genético do eucalipto (PMG) que as empresas PORTUCEL e SOPORCEL tinham vindo a desenvolver desde cerca de 1986.

Ambos os PMG iniciaram-se pela constituição de uma população de melhoramento a partir da selecção fenotípica de indivíduos com crescimento superior (árvores "plus") em povoamentos comerciais. Esta estratégia, por se aplicar às matas dispersas por todo o País, contribuiu para a constituição de uma base genética bastante alargada.

As árvores "plus" forneceram sementes para a constituição de ensaios de famílias de polinização aberta, que posteriormente foram complementados com a importação de colecções de sementes australianas. Forneceram ainda enxertos para as primeiras campanhas de cruzamentos controlados e, finalmente, após o corte, a rebentação de toixa para as primeiras tentativas de propagação vegetativa. Efectivamente, os dois PMG estavam cientes de que a floresta clonal seria a que maior ganho iria possibilitar, tão logo houvesse materiais genéticos de qualidade superior. Assim, durante anos foram estudados vários aspectos do processo de clonagem, como nutrição e condução dos pés-mãe, tipos de estacas mais convenientes, substratos e fertilizações, uso de hormona de enraizamento, irrigação e demais medidas que favorecessem a sobrevivência e o enraizamento das estacas. A multiplicação vegetativa das árvores "plus" permitiu também a instalação dos primeiros ensaios clonais e de pequenas áreas clonais piloto, durante 1992-1996.

Com a criação do RAIZ, em 1996, houve a unificação dos PMG da PORTUCEL e da SOPORCEL. Vários aspectos importantes foram desenvolvidos a partir de então, destacando-se:

- A decisão de clonar, ainda na fase de sementeira em viveiro, as plantas resultantes dos cruzamentos controlados, passando-se a instalar ensaios de campo com um novo tipo de material genético, de qualidade média superior ao seleccionado inicialmente. Deste modo também se assegurou que parte da população de melhoramento era clonada permitindo, no futuro, uma avaliação mais rigorosa do mérito individual, especialmente para variáveis de baixa heritabilidade, como o crescimento e a sobrevivência.
- O uso de metodologias de análise estatística sofisticadas e melhor adaptadas ao tipo de programa em curso. Efectivamente a análise tipo BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) foi adoptada e é hoje referida pela maioria dos programas bem sucedidos de melhoramento animal e florestal. Seu principal benefício é permitir a eficiente separação entre a contribuição genética e a ambiental para o desempenho observado de cada clone.
- A implementação de uma estratégia do tipo "Rolling-front", que permite acelerar o progresso genético do programa e cujos traços gerais são a possibilidade de agregação das etapas de avaliação, selecção, recombinação e recomendação de clones, em actividades

anuais que incidem sobre uma população única. Deste modo cria-se uma rotina que permite em cada ano realizar as diferentes tarefas, havendo vários ciclos de melhoramento que em simultâneo se desenvolvem (um ciclo que se termina, com a recomendação de clones para o viveiro, e outro que se inicia, com a selecção de novos progenitores), o que facilita a gestão de meios humanos e a sua optimização.

- A inclusão de características da madeira, como densidade básica e rendimento em pasta, nos critérios de avaliação e selecção. Estas características, combinadas com o volume individual e com a sobrevivência, determinam a produtividade de pasta / ha / ano, cujo incremento se traduz no objectivo maior do PMG do RAIZ.

O momento actual

Actualmente, o PMG do RAIZ gere uma rede de 143 ensaios que são, em certa proporção, dependendo da idade, anualmente medidos para as variáveis sobrevivência, altura, diâmetro, densidade e rendimento em pasta, actualizando a base de dados do programa. Em 2008 a análise BLUP sobre esta base de dados envolveu 223.684 registos, permitindo a avaliação genética de cerca de 45 mil indivíduos, entre materiais derivados das sementes de polinização aberta de raça portuguesa e australiana, e aqueles resultantes dos planos de polinização controlada conduzidos pelas sucessivas gerações de melhoramento.

Cada vez que a base de dados é renovada e re-analisada estimam-se os méritos genéticos dos indivíduos para cada uma das variáveis consideradas. Com estes méritos constroem-se índices de selecção para produtividade de pasta / ha / ano, além de outros também importantes, como o valor económico associado a cada clone. Pode-se assim, de modo transparente, ordenar todos os indivíduos geridos pelo PMG e definir quais deverão ser cruzados para a geração do ciclo seguinte de melhoramento. Define-se ainda quais deverão ser estudados com maior profundidade quanto à taxa de enraizamento e outros caracteres complementares, e finalmente, quais deverão ser recomendados para produção em larga escala nos Viveiros Aliança (VA), visando o fornecimento das plantas clonais para o GPS e para outros produtores privados.

Esta actividade constante de criação, avaliação, selecção e recomendação de novos materiais genéticos resulta na renovação periódica do portfolio de clones presentes nos VA, de forma que aqueles mais antigos são gradualmente substituídos por outros de maior valor genético. Cada clone transferido para os VA deve, para além de possuir valores altos dos índices de selecção atrás referidos, apresentar uma taxa de enraizamento que torna viável a sua produção em larga escala. Efectivamente o custo final da planta clonal está relacionado com a sua aptidão para enraizar na medida que uma grande componente diz respeito a mão-de-obra sempre gasta, quer a estaca venha a enraizar ou não. Considera-se que taxas de 60% são razoáveis para esta actividade, embora que se desejem sempre superiores.

Alguns dos materiais multiplicados nos VA podem ter alocação específica para determinadas condições edafo-climáticas (por exemplo, regiões com pronunciado deficit hídrico ou com maior probabilidade de ocorrência de uma determinada doença), embora via de regra não se verifiquem efeitos significativos da interacção "genótipos x ambientes" ao longo do tempo, ou seja, via de regra não há alteração expressiva na classificação dos clones de uma região para outra. Como a prática realizada pelo GPS nas suas florestações (próprias e arrendadas) consiste numa identificação, em cada propriedade, de zonas edafo-climáticas homogéneas através da interpretação cruzada da aptidão dos solos e das

circunstâncias climáticas que aí se verificam, é possível escolher os clones mais aptos em função da alocação indicada pelo PMG, aquando da elaboração do projecto florestal.

Actualmente os VA produzem plantas de 5 clones de *E. globulus* com elevado potencial de crescimento para as diferentes regiões do país. Estes materiais estão disponíveis para uso pelo gPS e por produtores privados independentes, apresentando ganhos em relação aos plantios seminais não melhorados da ordem de 15 a 25%, consoante às condições edafo-climáticas e à adequação das práticas silvícolas implementadas.

Perspectivas e desafios futuros

Não obstante os avanços conseguidos pelo PMG do RAIZ, torna-se relevante, diante do cenário global de necessidade crescente de produtos de pasta e papel, aumentar a competitividade da cadeia florestal através do desenvolvimento de clones de eucalipto ainda mais produtivos e com melhor qualidade da madeira. Neste âmbito, colocam-se algumas oportunidades interessantes, actualmente em curso de investigação no RAIZ:

- O desenvolvimento de clones híbridos entre *E. globulus* e eucaliptos tropicais, visando a combinação da óptima qualidade da madeira do primeiro e o rápido crescimento de outras espécies do género.
- A preparação para as eventuais mudanças climáticas a incidir sobre o País, através da avaliação e selecção de clones mais adaptados a condições de elevado stress hídrico, frio ou calor, bem como tolerantes às novas pragas e doenças.
- A disponibilização de clones de *E. globulus* ou híbridos com elevada aptidão para produção de biomassa para geração de energia renovável.
- O uso crescente da biotecnologia em apoio ao PMG, seja através da certificação da identidade clonal nos viveiros e ensaios de campo, ou da orientação de cruzamentos envolvendo indivíduos complementares do ponto de vista molecular, ou do aprendizado sobre o potencial da transformação genética (especialmente para caracteres qualitativos, como tolerância à determinadas doenças), ou do desenvolvimento da micro-propagação via cultura de tecidos.
- A aplicação de ferramentas complementares que permitam aumentar a eficiência do PMG, tais como o uso de indução de florescimento e selecção precoce visando ciclos de melhoramento mais curtos, ou o uso de metodologias rápidas, baratas e não destrutivas de avaliação da qualidade da madeira, ou ainda a ampliação do conhecimento sobre o controlo genético das características de interesse económico com subsequente melhoria nas estimativas de mérito genético dos clones.

Posters

Estratificar para Estimular a Germinação de Sementes Florestais – Tempos de Tratamento e Regime de Temperatura

Goreti Pinto

Autoridade Florestal Nacional. DRFN. UGFT-CENASEF. Amarante, Parque Florestal,
4600-250 AMARANTE.

Resumo. Para assegurar a sobrevivência da espécie, muitas árvores florestais foram desenvolvendo, ao longo do tempo, mecanismos que lhe permitiam suportar condições climáticas adversas, num estado de latência mais ou menos prolongado, para mais tarde eclodirem em segurança, quando as condições favoráveis voltassem a vigorar. É este o fenómeno designado por dormência da semente, e que, actualmente, se pretende contrariar, neste tempo apressado em que vivemos.

Existem diversos tipos de dormência e formas diversas de quebrá-la ou de estimular o processo de germinação, embora haja muitos factores que podem interferir no processo, e nem sempre fáceis de avaliar, como por exemplo o estado de maturação da semente, a data de colheita ou as condições de armazenamento até à realização da sementeira.

Tendo como ponto de partida a pesquisa bibliográfica e como complemento as práticas experimentais do CENASEF (Centro Nacional de Sementes Florestais), propomos tempos de tratamento e regime de temperatura para utilizar na estratificação de algumas espécies florestais, a fim de quebrar a dormência ou estimular o processo de germinação da semente.

Consideramos que a estratificação é um método mais prático para utilização em viveiro, do que, por exemplo, o recurso a ácidos, mais aconselhado para utilização em laboratório, para investigação.

Introdução

Para as pessoas que gostam de observar o despertar do mundo vegetal, basta colocar uma semente num vaso, regar e aguardar pacientemente, até ver surgir do solo os primeiros sinais de vida de um ser frágil, que pode vir a tornar-se um gigante no futuro. Falamos de árvores florestais. No entanto, para as pessoas cuja produção de plantas é uma actividade económica, não é possível, simplesmente, esperar com paciência que as sementes germinem. É imperioso acelerar o processo. Há espécies cuja semente germina em menos de um mês, mas há outras que podem levar um, dois, ou mesmo três anos a germinar.

HARTMANN *et al.*, 1990, definiram o fenómeno da dormência, como sendo "uma suspensão temporária do crescimento evidente de qualquer estrutura de uma planta que contenha um meristema", ou seja, trata-se de um período na vida de um organismo em que o crescimento pára e as actividades metabólicas são reduzidas ao mínimo, como reacção a factores fisiológicos e a factores ambientais. Este fenómeno pode ajudar os organismos a sobreviver em períodos de escassez de alimentos ou água, ou quando está demasiado frio. Quando a germinação ocorre imediatamente após a semente ter sido exposta a condições ambientais favoráveis, diz-se quiescente (HARTMANN *et al.*, 1990).

Para a germinação acontecer, em sementes totalmente dormentes, estas devem passar por mudanças físicas e/ou fisiológicas. A queda das sementes, em condições naturais, expõe-nas aos estímulos ambientais que induzem a quebra de dormência. Contudo, isto acontece de um modo não controlado e por isso a germinação pode acontecer após semanas, meses ou mesmo anos. Tratamentos eficazes que proporcionem condições ótimas para a quebra de dormência, podem reduzir grandemente esta variação natural (FINCH-SAVAGE, 2001).

Existe uma grande percentagem de espécies florestais cujas sementes apresentam dormências profundas. Há diferentes tipos ou combinações de dormências, mas a embrionária é a mais comum em árvores das zonas de clima temperado. A dormência embrionária pode ser quebrada durante o tratamento a baixa temperatura e com um teor elevado de humidade. Este processo de estratificação a frio tem sido usado desde há centenas de anos, mas não é linear a sua aplicação. O tempo necessário para refrigeração é diferente de um ano para outro, depende da espécie, e varia também entre lotes de semente da mesma espécie. No caso particular da semente de azevinho (*Ilex aquifolium*), por exemplo, é extremamente difícil fazê-la germinar rapidamente, devido ao seu tegumento impermeável e à imaturidade característica do embrião.

Métodos Experimentais

Tendo por base a pesquisa bibliográfica e as prática de viveiro utilizadas ao longo do tempo, foram sendo testados no CENASEF, nos últimos anos, diferentes tempos de estratificação a frio (aproximadamente 2°C), a quente (aproximadamente 20°C) e combinações de ambos, que permitiram apurar procedimentos que poderão ser utilizados com alguma regularidade.

A semente deve ser embebida em água durante 24 a 48 horas, para ficar bem hidratada, misturada com um substrato para proporcionar suporte à plântula, e humedecida a mistura, sem provocar encharcamento. O substrato pode ser constituído por areia e vermiculite (para uma libertação lenta da humidade), em partes iguais, e o seu volume deve ser apenas o necessário para envolver toda a semente. Durante a estratificação a mistura deve ser monitorizada regularmente (uma vez por semana), revolvida para promover o seu arejamento, e humedecida sempre que necessário. Se se verificar a emissão da radícula em algumas sementes, bastante tempo antes do término do tratamento, essas sementes deverão ser retiradas e colocadas no substrato final, para que não sejam danificadas na operação de arejamento da mistura.

As sementes do género *Pinus* não apresentam, normalmente, grandes dormências. Basta a sua conservação no frio (aproximadamente 2°C), por um período mínimo de três meses, sem hidratação prévia e sem adição de substrato, para que a germinação ocorra rapidamente e numa percentagem elevada.

No caso particular de *Pinus pinaster*, que pode ser conservada por vários anos, a 12°C, sem perda significativa de viabilidade, pode promover-se uma germinação mais homogénea da semente, mergulhando-a em água a 80°C por breves segundos, e colocando-a de seguida em água fria, durante 24 horas. Após esta operação deve ser espalhada para secar a sua superfície e depois conservada no frio (2°C) durante um mês, devendo a sementeira ser realizada de seguida.

Resultados e obtidos

No que respeita a espécies do género *Tilia*, e para as espécies *Sorbus aucuparia*, *Taxus baccata* e *Juniperus oxycedrus*, não foi possível ainda obter bons resultados no que respeita a percentagem de germinação, num espaço de tempo curto (inferior a 3 meses).

Relativamente a *Ilex aquifolium*, os resultados obtidos com e sem estratificação são idênticos (normalmente a germinação ocorre apenas após um ano de sementeira, com excepção de uma percentagem mínima – menos de 5%), pelo que acreditamos ser preferível não fazer qualquer tratamento à semente, evitando despesas e trabalho desnecessários.

Apresentam-se, no Quadro 1, os resultados obtidos para alguns ensaios realizados para diferentes espécies, nos últimos anos.



Figura 1 - Plântulas de *Acer pseudoplatanus*



Figura 2 - Plântulas de *Fagus sylvatica*



Figura 3 - Plântulas de *Juglans regia*



Figura 4 - Plântulas de *Prunus lusitanica*

Quadro 1 - Resultados de germinação obtidos no CENASEF, para alguns lotes de semente, após estratificação

Espécie	Lote n°	Proveniência	Tratamento	Nº sem	Sementeira	Germinação (%)					
						3ª semana	4ª semana	5ª semana	6ª semana	7ª semana	12ª semana
<i>Celtis australis</i>	35/05	Marco Canavezes	Estratificação a frio durante 8 semanas	100	04-04-2007			86			
<i>Celtis australis</i>	35/05	Marco Canavezes	Testemunha / sem tratamento	100	04-04-2007			2			
<i>Celtis australis</i>	78/06	Amarante	Estratificação a frio durante 8 semanas	100	04-04-2007			90			
<i>Celtis australis</i>	78/06	Amarante	Testemunha / sem tratamento	100	04-04-2007			0			
<i>Laurus nobilis</i>	70/06	Coimbra	Estratificação a frio durante 8 semanas	100	04-04-2007	9	35	41	46	51	
<i>Laurus nobilis</i>	70/06	Coimbra	Testemunha / sem tratamento	100	04-04-2007	0	0	11	27	37	
<i>Arbutus unedo</i>	42/04	Vila Pouca Aguiar	Estratificação a frio durante 8 semanas	100	04-04-2007	42	80	80	80	82	
<i>Arbutus unedo</i>	42/04	Vila Pouca Aguiar	Testemunha / sem tratamento	100	04-04-2007	0	0	5	9	10	
<i>Fraxinus angustifolia</i>	67/06	Bragança	Estratificação a frio durante 12 semanas	100	01-03-2007	70	100				
<i>Fraxinus angustifolia</i>	67/06	Bragança	Testemunha / sem tratamento	100	01-03-2007	0	27	44	48	49	
<i>Arbutus unedo</i>	57/06	Mondim Basto	Estratificação a frio durante 8 semanas	100	09-03-2007	86	89	91			
<i>Arbutus unedo</i>	57/06	Mondim Basto	Testemunha / sem tratamento	100	09-03-2007	0	1	14	28	30	
<i>Prunus lusitanica</i>	46/07	Vila Real	Estratificação a frio durante 12 semanas	100	12-02-2008			94	95		
<i>Prunus lusitanica</i>	46/07	Vila Real	Testemunha / sem tratamento	100	12-02-2008	0	0	0	0	0	
<i>Abies alba</i>	41/07	Bragança	Estratificação a frio durante 8 semanas	100	04-03-2008	48	75	80	84	86	
<i>Abies alba</i>	41/07	Bragança	Testemunha / sem tratamento	100	04-03-2008	4	12	24	42	62	
<i>Crataegus monogyna</i>	45/04	Vila Real	Estratificação a quente durante 14 semanas, seguida de estratificação a frio durante 20 semanas.	100	04-07-2008	8	40	41			
<i>Crataegus monogyna</i>	45/04	Vila Real	Testemunha / sem tratamento	100	04-07-2008	0	0	0	0	0	
<i>Prunus avium</i>	18/06	Macedo Cavaleiros	Estratificação a quente durante 2 semanas, seguida de estratificação a frio durante 15 semanas.	100	12-12-2007		45	72	77	87	93
<i>Prunus avium</i>	18/06	Macedo Cavaleiros	Testemunha / sem tratamento	100	12-12-2007		0	0	0	0	0
<i>Sorbus latifolia</i>	41/08	Guarda	Estratificação a frio durante 8 semanas	100	03-02-2009				92	95	
<i>Sorbus latifolia</i>	41/08	Guarda	Testemunha / sem tratamento	100	03-02-2009	0	0	0	0	0	
<i>Prunus laurocerasus</i>	19/08	Vila Real	Estratificação a quente durante 2 semanas, seguida de estratificação a frio durante 9 semanas.	100	19-02-2009	0	29	44	57	60	
<i>Prunus laurocerasus</i>	19/08	Vila Real	Testemunha / sem tratamento	100	19-02-2009	0	0	0	0	0	

Tratamentos recomendados

Os tempos de estratificação e o regime de temperatura aconselhados para estimular a germinação da semente, para as espécies com que habitualmente trabalhamos, estão indicados no Quadro 2.

"A frio" – 2°C

"A quente" - 20°C

Quadro 2 – Tratamento pré-germinativo recomendado para semente de algumas espécies florestais

Espécie	Tempo de estratificação e regime de temperatura
<i>Abies alba</i>	8 semanas a frio
<i>Acer negundo</i>	2 semanas a frio
<i>Acer pseudoplatanus</i>	12 semanas a frio
<i>Aesculus hippocastanum</i>	12 semanas a frio
<i>Arbutus unedo</i>	8 semanas a frio
<i>Berberis sp.</i>	3 semanas a frio
<i>Castanea sativa</i>	12 semanas a frio
<i>Cedrus atlantica</i>	4 semanas a frio
<i>Celtis australis</i>	8 semanas a frio
<i>Cercis siliquastrum</i>	Imersão em água a 82 °C, até arrefecer
<i>Corylus avellana</i>	12 semanas a frio
<i>Cotoneaster sp.</i>	12 semanas a quente seguidas de 12 semanas a frio
<i>Crataegus monogyna</i>	12 semanas a quente seguidas de 20 semanas a frio
<i>Cupressus lusitanica</i>	4 semanas a frio
<i>Fagus sylvatica</i>	12 semanas a frio
<i>Fraxinus angustifolia</i>	8 semanas a frio
<i>Ginkgo biloba</i>	10 semanas a quente seguidas de 14 semanas a frio
<i>Juglans sp.</i>	12 semanas a frio
<i>Juniperus sp.</i>	8 semanas a quente seguidas de 16 semanas a frio
<i>Laurus nobilis</i>	8 semanas a frio
<i>Ligustrum sp.</i>	8 a 12 semanas a frio
<i>Liriodendron tulipifera</i>	8 semanas a frio
<i>Magnolia sp.</i>	12 semanas a frio
<i>Olea europaea</i>	8 semanas a frio
<i>Pistacia sp.</i>	10 semanas a frio
<i>Pittosporum sp.</i>	Mergulhar alguns segundos em água a ferver
<i>Platanus sp.</i>	8 semanas a frio
<i>Prunus avium</i>	2 semanas a frio, seguidas de 15 semanas a quente
<i>Prunus laurocerasus</i>	2 semanas a quente seguidas de 9 semanas a frio
<i>Prunus lusitanica</i>	12 semanas a frio
<i>Prunus mahaleb</i>	Demolhar 3 dias e estratificar 11 semanas a frio
<i>Pyracantha sp.</i>	12 semanas a frio
<i>Quercus sp.</i>	12 semanas a frio
<i>Sorbus aucuparia</i>	8 semanas a frio
<i>Taxodium distichum</i>	8 semanas a frio
<i>Taxus baccata</i>	12 semanas a quente seguidas de 16 semanas a frio
<i>Tilia sp.</i>	16 semanas a quente seguidas de 16 semanas a frio
<i>Ulmus sp.</i>	8 semanas a frio

Considerações Finais

As sementes, como seres vivos que são, têm comportamentos muito diversos como resposta aos estímulos fisiológicos e ambientais. No que diz respeito ao teor de humidade de conservação, as sementes recalcitrantes (como por exemplo as de Quercíneas, *Castanea* sp., *Juglans* sp., etc.) não sobrevivem a teores de humidade muito baixos e, por isso, têm de ser armazenadas húmidas (30 a 40%), o que implica um tempo de conservação relativamente curto (inferior a um ano). As sementes ortodoxas (como por exemplo as de coníferas) suportam teores de humidade relativamente baixos (inferiores a 8%) e podem conservar-se por vários anos, sem perda significativa de viabilidade.

Existe, assim, alguma dificuldade na conciliação destes dois factores: por um lado é importante conservar a semente para anos de fraca produção e, por outro, é necessário fornecer semente em condições de germinação rápida, de modo a responder às necessidades de produção de plantas, em tempo útil. Um teor de humidade baixo e baixas temperaturas podem permitir conservar a semente por longos períodos, mas, em simultâneo, podem induzir dormências na semente (em conjugação com as características biológicas de cada espécie), precisamente para possibilitar essa conservação.

As dificuldades existentes para quebrar a dormência de sementes, prendem-se fundamentalmente, como pode observar-se no Quadro 2, com os longos períodos de tempo necessários para a realização dos tratamentos e com a heterogeneidade existente entre diversos lotes de semente ou mesmo dentro do próprio lote, para cada espécie.

As orientações agora fornecidas pretendem ser apenas uma base de trabalho para os produtores de plantas, dado que, atendendo à matéria-prima com que se trabalha, não há "receitas" nem regras rígidas para quebrar a dormência das sementes florestais. Cada obreiro encontrará o método mais adequado aos resultados que pretende obter.

Referências Bibliográficas

- APAT (Agency for the protection of the environment and for technical services), 2003. *Seed propagation of Mediterranean trees and shrubs*. Roma.
- BioMatNet – *ITEMS added to the BioMatNet DataBase*, May 2006. A multiplinary Approach to the Understanding and Efficient Handling of Seed Dormancy in Tree Species.
- EVANS, E., BLAZICH, F.A., 1999. *Overcoming Seed Dormancy: Trees and Shrubs* - 1/99 HIL-8704. North Carolina.
- FINCH-SAVAGE, W.E., 2001. *Cherry seed*. UK.
- FINCH-SAVAGE, W.E., 1998. *Farm woodland tree seed*. UK.
- FLORIANO, E.P., 2004. Germinação e dormência de sementes florestais, (Série Cadernos didáticos), Santa Rosa.
- HARTMANN, HUDSON T. *et al.*, 1990. *Plant Propagation – Principles and Practices*. Ptrentice-Hal International, Inc., London.
- Sementes Florestais – Catálogo 2008-2010, CENASEF.
- MARGHERINI, R, NIN, S., - Experiments on seed germination of some *Tilia* spp. – ISHS Acta Horticulturae 331: WOCMAP I – Medicinal and Aromatic Plants Conference: Part 3 of 4.

A Enxertia do Castanheiro em Carvalho

Rui Conceição, Paulo Barracosa, Helder Viana e Daniela Teixeira Costa

Escola Superior Agrária de Viseu. Departamento de Produção Vegetal. Quinta da Alagoa -
Ranhados, 3500-606 VISEU

Resumo. O castanheiro tem uma importância histórico-cultural como talvez nenhuma outra espécie florestal do nosso país. Desde o Paleolítico que o castanheiro acompanha o Homem e tem para ele uma importância crucial. Por isso é necessário fazer algo que contribua para a sua preservação. É do conhecimento geral que as principais causas do desaparecimento de muitos exemplares e até de povoamentos inteiros são devidos as más práticas agrícolas, mas principalmente por causa das doenças, nomeadamente, o cancro do castanheiro e a tinta do castanheiro. A enxertia pode vir a contribuir em muito para a preservação do castanheiro. Com a realização deste trabalho pretendemos obter árvores viáveis e com frutificação através da enxertia do castanheiro (*Castanea sativa*) em carvalho (*Quercus robur*). Este trabalho foi realizado no concelho de Viseu de 2006 a 2008 e utilizamos a enxertia inglesa. Relativamente aos resultados deste trabalho obtivemos uma taxa de sucesso dos enxertos de 80% em 2006 e 2007 e de 100% em 2008. O maior comprimento verificou-se nas plantas enxertadas no ano 2007. A altura da enxertia não foi influenciada significativamente pelo ano de realização da enxertia. Quanto ao desenvolvimento dos estados fenológicos verificamos que os enxertos apresentavam um bom desenvolvimento e logo no primeiro ano registaram floração e alguns deles frutificaram. Como trabalho futuro pretendemos acompanhar estas plantas ao longo dos próximos anos a fim de observarmos quer o desenvolvimento fisiológico quer a qualidade dos frutos que irão produzir.

Palavras-chave: *Castanea sativa*, *Quercus robur*, enxertia, taxa de sucesso, enxerto, porta-enxerto

Introdução

No período de 1980 a 2006, a área de castanheiros tem vindo a aumentar em Portugal, sobretudo na região de Trás-os-Montes. De facto, a diminuição da produção europeia baseada na cultura de montanha, com o consequente aumento da valorização nos mercados internacionais, os incentivos à plantação no âmbito de programas comunitários e as condições edafo-climáticas favoráveis, constituem alguns dos factores que estão na origem desta evolução. Entre os anos extremos da série, a área de soutos no país aumentou mais de 16 mil hectares, passando de 13 683 ha para 30 253 ha. A produção ainda não reflecte este aumento de área, pois as novas plantações efectuadas, sobretudo na década de 90, ainda não se encontram em plena produção (INE, 2007).

Dos 30 mil hectares, que constituem a área de castanheiros no Continente, apenas 0,5%, correspondem a área com produção comercializada e certificada como DOP. Devido às crescentes exigências do mercado em produtos de elevada qualidade, e para a preservação do património genético nacional, foram criadas regiões demarcadas com Denominação de Origem Protegida para a valorização das variedades de castanha regionais: Castanha da Terra Fria, Castanha da Padrela, Castanha dos Soutos da Lapa e Castanha do Marvão (COSTA *et al.*, 2008).

O castanheiro tem sido uma espécie muito importante na economia das populações rurais, por ter dupla aptidão: frutos e madeira. Continua a ser uma excelente opção cultural em muitas regiões do país, possuindo as variedades portuguesas qualidades reconhecidas no mercado internacional. A produção média é de cerca de 1ton/ha, existindo potencial para aumentar para 3 ton/ha (DGRF, 2006).

As doenças mais importantes que afectam o castanheiro são originadas por fungos (doenças criptogâmicas). Alguns destes fungos afectam a parte viva da planta, nomeadamente o sistema radicular, que a debilitam e podem levar a morte (doença da tinta), enquanto outros afectam a madeira provocando-lhe podridões, que actuam mais lentamente mas que quase sempre levam também a sua morte (cancro do castanheiro) (SERRANO, 2003).

Material e Métodos

O ensaio decorreu numa exploração do Distrito de Viseu de 2006 a 2008. De acordo com a classificação de Thornthwaite o clima do Distrito varia essencialmente entre o tipo A (Super Húmido) e o tipo B4 (Muito Húmido), sendo classificado de clima mediterrâneo com estação seca bem demarcada pela classificação de Koppen (ABREU *et al.*, 2004).

Para os porta-enxertos utilizamos plantas de *Quercus robur*, e os garfos foram retirados de uma árvore sã de *Castanea sativa*. O material que foi utilizado na enxertia foi desinfectado, a fim de evitar transmissões de doenças. O ensaio tinha dez repetições de uma planta. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados. As enxertias foram iniciadas com um corte o mais plano possível na árvore que vai servir de porta-enxerto. Em seguida realizamos a preparação dos cortes em bisel no cavalo e depois relativamente com o mesmo comprimento no garfo. Depois realizou-se uma fenda vertical (lingueta) no terço inferior do corte mais ou menos até à altura do seu início. No cavalo, o corte correspondente é posicionado no terço superior, ambos os cortes foram feitos com muito cuidado para não separar a casca do cambio. Em seguida, o garfo foi inserido no cavalo de forma que as linguetas se entrossem, criando-se, dessa forma, uma ligeira curvatura para facilitar a inserção do garfo. Para que esta curvatura não dificulte o contacto íntimo dos câmbios, os cortes foram sempre feitos um pouco mais longos do que o necessário. A ligação do enxerto foi fácil uma vez que as duas peças estão bastante unidas pelas forças mecânicas activas nesta área, devido as linguetas. Através deste processo consegue-se que uma grande área de zonas cambiais fique em contacto que a união seja fortalecida mecanicamente através dos cortes em lingueta. Posteriormente isolou-se o ponto da enxertia com uma fita auto-adesiva, para evitar perdas de humidade e libertação de seiva (choro), tanto do cavalo, como do garfo. Por fim com a ajuda de um pincel, colocou-se um pouco de cera cicatrizante na extremidade do garfo, a fim de evitar a sua dissecação.

Mensalmente foi feito o registo da espessura dos rebentos, altura da árvore e o acompanhamento dos estados fenológicos através de uma escala de 1 a 8 a que 1 - corresponde Olho dormente; 2 – Abrolhamento; 3 - Rebentos de 0 a 5cm; 4 - Rebentos de 5 a 10cm; 5 – Rebentos de 10 a 30cm; 6 - Rebentos com mais de 30cm; 7 - Floração e 8 – Frutificação.

Resultados e Discussão

Relativamente aos enxertos realizados no ano de 2006 todos rebentaram e pareciam ser viáveis, e desses 20% não rebentaram em 2007. Em 2007 também não rebentaram 20% dos enxertos. No ano de 2008 rebentaram todos os enxertos realizados.

Em 2008 a espessura média dos enxertos variou entre 3,3cm e 0,99 cm para as enxertias realizadas em 2006 e 2008 respectivamente. A altura média das plantas era de 180 cm para as plantas enxertadas em 2006, 283 cm para as de 2007 e de 84 cm. Relativamente aos estados fenológicos verificámos que 40% das plantas enxertadas em 2006 apresentaram frutificação, e das enxertadas em 2008 frutificaram 28%.

Conclusões

Com este trabalho verificamos que nos anos de 2006 e 2007 obtivemos uma taxa de sucesso de 80% e em 2008 de 100%. Ao longos dos 3 anos as plantas evoluíram progressivamente face à normalidade do crescimento do castanheiro. Relativamente aos estados fenológicos praticamente todos os enxertos tiveram um bom desenvolvimento e logo no primeiro ano registaram floração e alguns deles frutificaram.

Como trabalho futuro pretendemos acompanhar estas plantas ao longo dos próximos anos a fim de observarmos quer o desenvolvimento fisiológico quer a qualidade dos frutos que irão produzir.

Bibliografia

- INE, 2007. *Portugal Agrícola 1980-2006*. Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISBN 978-972-673-893-0.
- DGRF, 2006. *Manual de Procedimentos para a elaboração de planos de Gestão Florestal em Matas Nacionais e Perímetros Florestais*. Lisboa.
- SERRANO, 2003. *O Castanheiro. Guia de Boas Práticas*. Léon. Gráficas ALSE, SL.
- COSTA, R., RIBEIRO, C., VALDIVIESSO, T., AFONSO, S., BORGES, O., SOEIRO, J.C., AUGUSTO, H.C., ASSUNÇÃO, A., FONSECA, L., AUGUSTA, C., CRUZ, M.H., SALAZAR, M., SOARES, F.M., SEQUEIRA, J., CORREIA, P., LIMA, M.J., 2008. *Variedades de Castanha das Regiões Centro e Norte de Portugal*. Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, I.P. INRB, I.P. Projecto AGRO 448. Lisboa. ISBN: 978-989-95658-2-1.