

Resultados Preliminares dos Testes Genéticos com *Cryptomeria japonica* na Região Autónoma dos Açores

C. Faria¹, J. Belerique², C. Nobrega³, L. Penacho², M. Rocheta⁴ e M. H. Almeida¹¹Instituto Superior de Agronomia. Dep. Eng. Florestal, Tapada da Ajuda, 1349-017 LISBOA

²Serviço Florestal da Terceira, Rua Francisco Ornelas 12, 9701-863 ANGRA DO HEROÍSMO

³Direcção Regional dos Recursos Florestais

⁴Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Quinta do Marquês, Apartado 12, 2781-997 OEIRAS

Resumo. Tendo como base, a importância económica da *Cryptomeria japonica* na Região Autónoma dos Açores, e face ao desconhecimento sobre a origem das populações, surgiu a necessidade de avaliar a variabilidade genética da população açoriana, para tal foi instalado um ensaio de proveniências. Paralelamente, a descendência de árvores seleccionadas em povoamentos locais, está a ser avaliada em ensaios de descendências para confirmação da sua superioridade e do controlo genético das características eleitas. Simultaneamente, através da utilização de marcadores moleculares pela técnica *mSP*-PCR pretende-se antecipar informações relativamente à variabilidade genética das populações açorianas.

A taxa de sobrevivência foi muito elevada em todos os ensaios, média acima dos 85%. Os acréscimos em altura total obtidos no 2º ano após a plantação, indicam diferenciação comportamental entre as plantas das origens açorianas e as da área de distribuição natural; as açorianas demonstram, em geral, melhores comportamentos. O ensaio de descendências ainda não permite a diferenciação de agrupamentos de famílias, embora se observem diferenças significativas entre estas. A análise da matriz dos coeficientes de similaridade de Dice indicou valores médios de similaridade relativamente elevados, na ordem dos 0,64, sendo o intervalo de variação mais estreito quando as populações açorianas foram comparadas entre si.

Introdução

À semelhança do que aconteceu em toda a Europa com outras essências florestais, a *C. japonica* foi introduzida nos Açores como árvore ornamental, em meados do século XIX, na Ilha de S. Miguel. Desconhece-se a origem da semente utilizada nas primeiras plantações, assim como se houve introdução de novos lotes. A excelente adaptação e os rápidos crescimentos que esta espécie apresentou justificaram a generalização da sua utilização pelo território açoreano. A reconhecida importância económica da *Cryptomeria japonica* no sector florestal da Região Autónoma dos Açores e a necessidade de uma utilização mais racional e produtiva desta espécie, 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 sanidade dos povoamentos de *Cryptomeria*, assim como melhorar a qualidade matéria prima produzida.

Com o objectivo de avaliar a variabilidade genética da população açoriana comparativamente com populações da área de distribuição natural da espécie, em 2002 foram instalados ensaios de proveniências em 3 locais na Região Autónoma dos Açores. Paralelamente, a descendência de árvores seleccionadas em povoamentos locais, está a ser avaliada em ensaios para confirmação da sua superioridade e estimativa do controlo genético das características eleitas. Simultaneamente, através da utilização de marcadores moleculares pela técnica *mSP*-PCR (*microsatellite-primed*

PCR) pretende-se antecipar informação relativamente à variabilidade genética das populações açoreanas.

Material e Métodos

Ensaio de Proveniências

Nestes ensaios estão representados 55 lotes de sementes, dos quais 49 são provenientes de 4 das 5 regiões de melhoramento do Japão, a área de distribuição natural da *C. japonica* (Kansai, Kyuchu, Kanto e Tohoku) (Figura 1), os lotes correspondem a famílias de árvores *plus* que se encontram em pomares de sementes, a famílias de árvores *plus* resistentes aos danos causados pela neve e a semente comercial (oferecidos pelo *Forest Breeding Tree Center* do Japão). Os restantes 6 lotes representam as populações onde a espécie é exótica; 5 lotes são representativos da população açoriana (Olavo Simas (Ilha do Faial), Chaves (Ilha de S. Miguel), Fontinhas (Ilha Terceira), Bitáculas (Ilha do Pico) e um lote constituído por semente comercial colhida no Perímetro Florestal do Nordeste) e um 6º lote proveniente da Coreia representando 1 pomar de sementes.

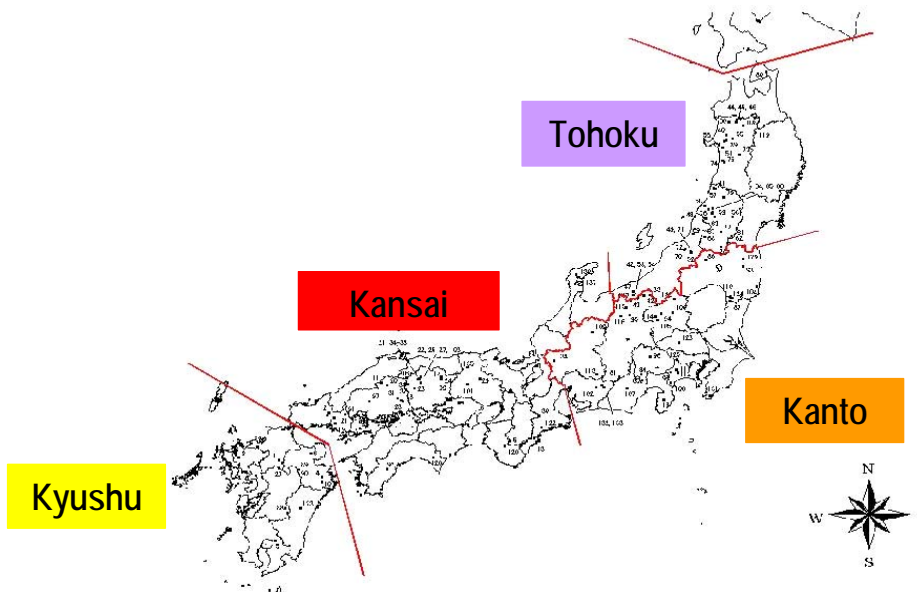


Figura 1: Mapa de distribuição dos diferentes lotes de semente, nas 4 grandes regiões de melhoramento do Japão.

A produção das plantas ocorreu no Viveiro da Achada, no Nordeste, Ilha de São Miguel, pela metodologia tradicionalmente utilizada nos viveiros da Direcção Regional dos Recursos Florestais (DRFF) da Região Autónoma dos Açores, por raiz nua, com 1 ano de seminário e 1 ano de plantório (1+1). Foram instalados 4 campos experimentais, 3 dos quais na Primavera de 2002 e o 4º na Primavera de 2003, na Tabela 1 estão descritas as condições relativas a cada um dos campos experimentais, assim como o nº de lotes testados em cada um deles. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados completos, com 5 plantas de cada lote por parcela, com 7 blocos por campo experimental, em todos eles havia pelo menos 26 lotes em comum. O compasso usado foi de 2,5m x 1,5m (entre linhas e na linha, respectivamente), foram

utilizadas redes protectoras. Foi efectuada uma medição da altura total de todas as plantas aquando da plantação e novamente após o 1º e o 2º ano, simultaneamente com a avaliação da sobrevivência.

Foi avaliado o efeito da origem do lote de semente na sobrevivência e no crescimento da altura ao 2º ano após a plantação através da Análise de variância (ANOVA) em que foi considerado um modelo linear misto, não equilibrado:

$$X_{ijk} = \mu + A_i + b_j + (Ab)_{ij} + \varepsilon_{ijh}, \quad i=1,\dots,k; \quad j=1,\dots,m; \quad h=1,\dots,n$$

sendo μ a média geral, a proveniência A_i é considerada um efeito fixo e o bloco b_j , um efeito aleatório. Tendo-se previamente confirmado que eram satisfeitos os pressupostos da ANOVA, nomeadamente a homogeneidade da variância para a variável em causa. Para a satisfação destas condições foi efectuada a transformação angular da sobrevivência ($y = \arcsen \sqrt{p/100}$). Foi utilizado o procedimento PROC GLM do *software SAS*® V8 (SAS Institute Inc., 1999). O método dos contrastes (declaração *Contrast*) permitiu identificar a existência de diferenças significativas entre: i) populações açorianas e as da área de distribuição natural; ii) entre as populações provenientes da área onde a espécie é exótica; iii) entre as populações açorianas e as da área da região de Tohoku; iv) entre as populações provenientes da área onde a espécie é exótica; iii) entre as populações açorianas e as da área da região de Kanto; v) entre as populações açorianas e as da área da região de Kansai; vi) entre as populações açorianas e as da área da região de Kanto; v) entre as populações açorianas e as da área da região de Kyushu.

Tabela 1: Ensaios de proveniências instalados no Arquipélago dos Açores

Ilha	Localização	Ano de Instalação	Nº lotes presentes
Faial	Aberto	Primavera 2002	55
S.Miguel	Labaçal		26
Terceira	Pico Gordo		37
Terceira	Sta Bárbara	Primavera 2003	20

Ensaio de Descendências

A partir do ano de 1999, têm vindo a ser seleccionados indivíduos com características superiores nos povoamentos de *C. japonica* nas diferentes ilhas, processo que ainda persiste, tendo sido considerados os seguintes parâmetros: estado sanitário, dominância, altura, diâmetro a 1,30 m (dap), forma e verticalidade do fuste, proporção da copa e desramação natural. No ano de 2000, com o apoio de escaladores do CENASEF foi colhida semente. O processo de produção das plantas decorreu nas mesmas condições já referidas (1+1) para o ensaio de proveniências, e durante o mesmo período temporal.

Também na Primavera de 2002, foram instalados três campos experimentais com um número diferenciado de lotes presentes, num conjunto de 5 ensaios instalados até ao fim do ano de 2003 (Tabela 2). O delineamento experimental utilizado foi igual ao do ensaio de proveniências, assim como o compasso utilizado e a protecção das plantas.

Em Março de 2003 e de 2004, a sobrevivência e a altura total das plantas foram avaliadas. O modelo utilizado é igual ao utilizado para as proveniências, sendo o factor família o efeito fixo. Para a comparação múltipla de médias usou-se o método de Student-Newman-Keuls.

Tabela 2: Ensaios de descendências instalados até ao fim de 2003, no Arquipélago dos Açores

Ilha	Localização	Ano de Instalação	Nº lotes presentes
Faial	Aberto	Março de 2002	17
S.Miguel	Labaçal	Março/Abril de 2002	23
Terceira	Pico Gordo	Março de 2002	23
Sta Maria	Pastagens nº46,47 e 56	Janeiro de 2003	29
Terceira	Sta Bárbara	Janeiro de 2003	20

Estudo da diversidade genética pela utilização de marcadores moleculares

Na técnica *msp-PCR*, utilizada neste estudo, recorre-se a um único iniciador por reação para detectar polimorfismo ao nível das regiões de emparelhamento do iniciador, utilizando para tal iniciadores com sequências repetitivas (Meyer *et al.*, 1993; Zietkiewicz *et al.*, 1994), esta técnica não necessita de um prévio conhecimento do genoma e produz padrões altamente polimórficos (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Tsumura *et al.*, 1996; Nagaoka *et al.*, 1997). Neste estudo consideraram-se amostras foliares de 5 plantas por lote: - 5 lotes açoreanos, 1 lote coreano e 5 lotes Japoneses representativos de 3 das regiões de melhoramento do Japão: Kyushu, Kansai e Tohoku. Os lotes japoneses foram escolhidos com o objectivo de representar indivíduos com características comportamentais o mais distinta possível e que simultaneamente pudessem apresentar uma ampla diversidade genética. Foi também considerada no estudo, a descendência de 28 árvores-*plus*.

O processo de extração de ADN, a partir de agulhas de *C. japonica*, foi feito tendo como base o protocolo de Plomion *et al.* (1995), após alguns ensaios de optimização. A amplificação do ADN foi obtida num termociclador Uno-Thermoblock (Biometra). Foram testados 12 iniciadores, mas utilizados apenas 6, que a seguir se referenciam: 1) (GTGC)₄; 2) (GTG)₅; 3) (GAC)₅; 4) (GACA)₄; 5) (AGC)₆TY; 6) DDB(CCA)₅ (Meyer *et al.*, 1993). As condições de amplificação do ADN variaram para os diferentes iniciadores, com 35 ciclos de 35 s a 59,4°C (no caso dos iniciadores 1 e 2), a 50,9°C (para o iniciador 4) e a 55°C (para o iniciador 6), tendo as fases de desnaturação e de extensão ocorrido nas mesmas condições. O processo de amplificação de ADN com os iniciadores 3 e 5 decorreu com uma reacção de “Touch-down” a 70-65°C e 60-55°C, respectivamente. Os fragmentos amplificados foram captados em imagem pelo sistema *Quantity One* (BioRad), a análise foi efectuada tendo como base o registo da presença ou ausência de bandas para cada amostra, sob a forma de matriz binária (amostras x marcadores).

RESULTADOS

Ensaios de Proveniência

s

Em todos os ensaios a sobrevivência, 2 anos após a plantação, foi elevada, destacando-se o ensaio do Aberto com uma sobrevivência de 97%(±2,0), o ensaio do Labaçal apresentou o pior resultado, com valores médios de 91% (±4,0). Simultaneamente, em todos os ensaios houve uma duplicação nos acréscimos em altura obtidos no 2º ano após a instalação, explicada pelo stress resultante da plantação e pela aclimação das plantas às novas condições ambientais.

A análise de variância dos acréscimos em altura no 2º ano indicaram diferenças altamente significativas entre proveniências (p<0,001), em todos os ensaios. Na Tabela 3, são apresentados os resultados dos contrastes efectuados entre grupos de populações, referentes às hipóteses já referenciadas.

A figura 3 permite uma melhor percepção do comportamento dos lotes pertencentes aos diferentes grupos de origem considerados neste estudo, havendo uma predominância dos lotes açoreanos nas primeiras posições da ordenação decrescente.

Tabela 3 – Valores de Prob. $F_{Calc.} > F_{Tab.}$ obtidos através de contrastes para os diferentes agrupamentos de proveniências

Hipótese	Labaçal	Pico Gordo	Aberto
(1) Açores ≠ Área Natural	SIM (p<0,0001)	SIM (p<0,0001)	SIM (p<0,0001)
(2) Açores ≠ Coreia	NÃO (p<0,4507)	NÃO (p<0,2821)	NÃO (p<0,2376)
(3) Açores ≠ Tohoku	SIM (p<0,0001)	SIM (p<0,0001)	SIM (p<0,0001)
(4) Açores ≠ Kanto	SIM (p<0,0001)	SIM (p<0,0001)	SIM (p<0,0001)
(5) Açores ≠ Kansai	NÃO (p<0,4266)	SIM (p<0,0001)	SIM (p<0,0001)
(6) Açores ≠ Kyushu	NÃO (p<0,7161)	NÃO (p<0,7375)	SIM (p<0,0001)

Aberto-Faial

Pico Gordo-Terceira

Labaçal-S.Miguel

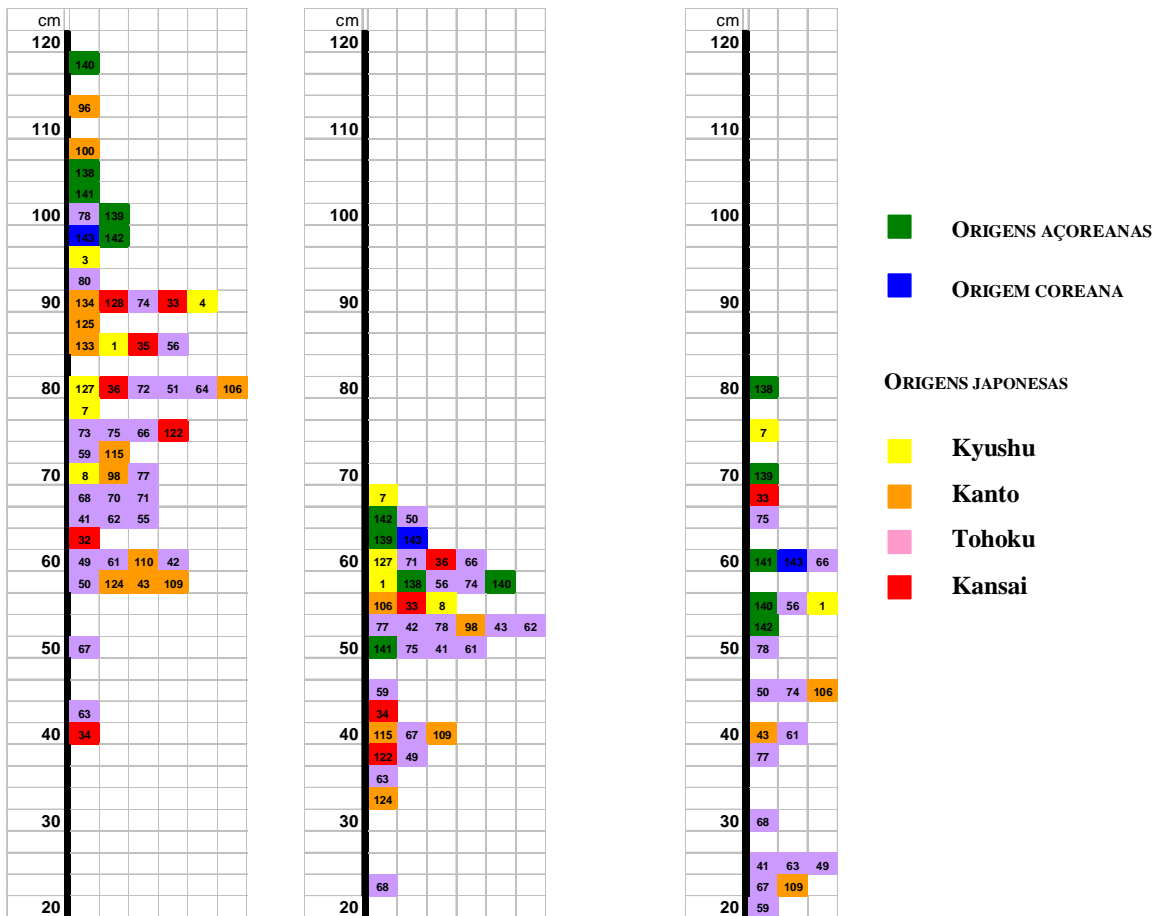


Figura 3: Acréscimos médios em altura, obtidos no 2º ano de instalação, pelos lotes de plantas resultantes das diferentes origens geográficas.

Ensaio de Descendências

A taxa de sobrevivência obtida nos ensaios de descendência foi muito elevada, com valores de 99,0%(±0,4) no ensaio do Aberto, de 99,0%(±0,3) no do Pico Gordo e de 94,1%(±1,1) no do Labaçal. Tal como tinha acontecido nos ensaios de proveniências, os acréscimos em altura obtidos no 2º ano após a instalação foram muito superiores aos obtidos no 1º ano. A análise de variância indicou para todos os ensaios, diferenças significativas para a componente família ($p < 0,001$). A análise de comparação de médias, pelo método SNK estabeleceu os diferentes grupos de significância que estão representados na figura 4, não havendo ainda famílias que se destaquem pelo seu comportamento extremo, o que seria de esperar dada a precocidade da avaliação.

Aberto-Faial		Pico Gordo-Terceira		Labaçal-S.Miguel	
Famílias	Acrésc. Altura (cm)	Famílias	Acrésc. Altura (cm)	Família	Acrésc. Altura (cm)
SMT27	125,1	SMT10	70,6	SMT16	95,1
SMT18	122,2	SMT2	65,8	SMT40	81,8
SMT16	121,2	SMT31	65,5	SMT5	75,4
SMT6	120,8	SMT13	65,3	SMT7	73,4
SMT7	117,8	SMT7	62,4	SMT11	73,2
SMT31	117,3	SMT11	61,7	SMT10	69,8
SMT32	116,1	SMT29	61,5	SMT18	69,0
SMT3	112,3	SMT12	61,0	SMT31	66,5
SMT36	11,9	SMT32	60,3	SMT13	65,9
SMT1	110,6	SMT30	58,1	SMT1	61,3
SMT5	107,8	SMT14	57,9	SMT15	60,8
SMT4	107,0	SMT16	57,6	SMT3	58,2
SMT15	103,6	SMT27	57,6	SMT6	58,2
SMT13	103,2	SMT5	56,9	SMT27	53,6
SMT11	99,2	SMT40	55,3	SMT4	53,5
SMT10	98,7	SMT1	54,7	SMT32	51,7
SMT40	93,8	SMT18	52,3	SMT36	42,6
		SMT15	51,3		
		SMT4	49,6		
		SMT20	49,0		
		SMT3	48,9		
		SMT36	46,1		
		SMT6	45,0		

Figura 4: Acréscimos médios em altura obtidos pelas famílias de criptomeria, no 2º ano de instalação.

Análise pela utilização de marcadores moleculares

A análise da matriz dos coeficientes de similaridade de Dice revelou valores médios de 0,635 (±0,436), quando comparadas as populações da área de distribuição natural e as da área onde a espécie foi introduzida. Na comparação apenas das populações açoreanas, o valor médio foi de 0,647 (±0,258). Na descendência das árvores *plus*, obtiveram-se valores médios de 0,650 (±0,484). Os valores de similaridade obtidos são na generalidade elevados, indicando elevada proximidade entre as entidades genóticas em estudo, embora as populações açoreanas demonstrem uma menor amplitude de variação. Na análise aglomerativa pelo método UPGMA (NTSYSpc (v2,01b)), quando consideradas todas as populações obteve-se um dendograma com coeficiente cofenético de 0,65; nas descendências das árvores *plus*, o valor obtido foi de 0,62 (dendogramas não apresentados). Estes valores são indicativos de uma considerável perda de

informação na simplificação matemática, aquando da transformação da matriz de similaridade em dendograma, o que vem confirmar os baixos valores de “bootstrap” para cada nó (estimativa da robustez de cada agrupamento), originando por isso, dendogramas pouco explicativos.

CONCLUSÕES

A avaliação dos desempenhos, em sobrevivência e em crescimento, das diferentes entidades genéticas aqui referenciadas é ainda muito preliminar, todavia é notório o bom comportamento dos lotes açoreanos em todos os ensaios, indiciando a adaptação da espécie às condições açoreanas, havendo já porventura uma raça local. Os resultados obtidos com os marcadores moleculares parecem indicar que a população açoreana terá uma variabilidade genética inferior à das populações amostradas da área de origem. O comportamento de alguns lotes japoneses e o da Coreia sugerem o interesse em alargar a base genética da população açoreana com estas populações.

BIBLIOGRAFIA

- Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ and Vilgalys R. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprint used as single primers in polymerase chain reaction to distinguish strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Biol* 31:2274-2280
- Nagaoka T. and Ogihara Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 94:597-602
- Plomion, C., Bahrman, N., Durel, C.E. and O'Malley, D.M. 1995. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity* 74: 661-668
- Tsumura Y. Ohba K and Strauss SH 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor Appl Genet* 92:40-45
- Williams E.R. and Matheson A.C. *Experimental Design and Analysis for Use in Tree Improvement*. CSIRO. Melbourne
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A. & Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain-reaction amplification. *Genomics* 20:176-183