Silva Lusitana ***14****(1) : 23 - 31, 2006*
© EFN, Lisboa. Portugal

Polinizações Controladas em *Castanea* spp. e Caracterização da Descendência e Progenitores por Microsatélites

Teresa Valdiviesso e Rita Lourenço da Costa
Investigadoras Auxiliares
Estação Florestal Nacional. Departamento de Ecofisiologia e Melhoramento Florestal.
Quinta do Marquês, 2780-159 OEIRAS

Sumário. O presente estudo apresenta os primeiros resultados obtidos em polinizações controladas, efectuadas para a produção de populações de híbridos entre progenitores resistentes às doenças da tinta e cancro (*Castanea crenata* Sieb. & Zucc e *Castanea mollissima* Blume) e progenitores susceptíveis (*Castanea sativa* Mill), para mapeamento de genes de resistência a doenças provocadas por fungos. A escolha das cultivares (progenitores femininos) resultou de uma selecção, visando as de maior interesse económico e a escolha dos progenitores masculinos (*C. crenata* e *C. mollissima*) foi baseada na resistência às doenças. Para um total de 68 isolamentos, realizados em 4 cultivares, polinizaram-se cerca de 408 flores. A produção total de sementes híbridas foi de 21 frutos. Estas sementes foram germinadas resultando 11 plantas. Foi extraído DNA dos progenitores bem como da descendência, aplicados microsatélites nucleares e foi analisada a herança dos loci para os diferentes microsatélites entre progenitores e a descendência.
Palavras-chave: castanheiro; polinizações controladas; resistência a fungos

Controlled Pollinations in *Castanea* spp. and Caracterization of the Parents and Progenies for Microsatellities

Abstract. This study presents the first results obtained in controlled pollinations, performed for the production of hybrid populations involving resistant (*Castanea crenata* Sieb. & Zucc *and Castanea mollissima* Blume) and susceptible *(Castanea sativa* Mill*)* genotypes to ink and blight diseases thus enabling the mapping of genes resistant to fungal diseases. The cultivars selection (the feminine parent) was targeted on the individuals with the greatest economic interest, while the choice of the masculine parents (*C. crenata* and *C mollissima*), on the diseases resistance. For the total of 68 isolations in 4 cultivars, about 408 flowers were pollinated. The total production of hybrid seeds was of 21 fruits. These seeds were then germinated, resulting in 11 plants. DNA was extracted both from the parents, as well as their progeny and nuclear microsatellites were applied. The inheritance of the loci, for the different microsatellites, involving parents and progenies, was then analysed.
Key words: chestnut; cross-pollinations; fungal resistance

1º Autor E-mail: teresa.valdiviesso@efn.com.pt

Pollinisations Contrôlées pour Castanea spp. et Caractérisation de la Descendance et des Progéniteurs par Microsatellites

Résumé. Cette étude présente les premiers résultats obtenus en pollinisations contrôlées, effectués pour la production de populations d'hybrides en utilisant des lignées parentales résistantes (*Castanea. crenata* Sieb. & Zucc *et Castanea mollissima* Blume) et sensibles (*Castanea sativa* Mill) à la maladie de l'encre et du chancre, pour une future modélisation des gènes résistants aux maladies provoquées par des champignons. Le choix des cultivars (lignées femelles) a été l'objet d'une sélection parmi les individus réalisé dans le plus grand intérêt économique, alors que le choix des lignées mâles (*C. crenata et C mollissima*), s'est basée sur la résistance à la maladie de l'encre et du chancre. Pour un total de 68 isolements en 4 cultivars, prés de 408 fleurs ont été pollinisées. La production a été de 21 semences hybrides. Ces semences ont été mises à germer, et nous avons obtenu 11 pieds. L'ADN a été extrait à partir des parents, ainsi que de leur descendance; des microsatellites nucléaires ont été appliqués. La transmission des loci pour les différents microsatellites, entre parents et descendance, a été alors analysée.
Mots clés: châtaignier, pollinisations contrôlées.

Introdução

A cultura do castanheiro desempenhou no passado um papel fundamental na economia das populações rurais de montanha, em Trás-os-Montes. A espécie *Castanea sativa* Mill. possuía um duplo papel, fornecendo por um lado a base da alimentação das comunidades rurais, bem como madeira de qualidade superior, utilizada na construção de habitações e de mobiliário. O aparecimento de outras culturas mais rentáveis, a alteração dos hábitos alimentares e a progressão de algumas doenças, deram origem a que se verificasse uma regressão da área plantada de castanheiro e um desuso da utilização da castanha na alimentação humana. No entanto, a partir da década de 80, tem-se verificado uma nova apetência por parte dos agricultores na plantação desta espécie, resultado dos incentivos à plantação, no âmbito de programas comunitários e do elevado preço que a castanha tem atingido.

Duas graves doenças têm vindo a ser responsáveis pela morte de castanheiros e que não podem deixar os produtores indiferentes; a doença da tinta na zona radicular e o cancro na zona aérea. Em qualquer dos casos os meios de luta existentes não são completamente eficazes, caminhando-se no sentido da obtenção de plantas tolerantes às referidas doenças, através do melhoramento genético.

Este trabalho apresenta os primeiros resultados das polinizações controladas efectuadas entre um progenitor sensível à doença da tinta (*Castanea sativa* Mill) e progenitores resistentes (*C. crenata* Sieb. & Zucc e *C. mollissima* Blume), para a constituição de uma população de base com pedigree conhecido (população F1) que será ulteriormente utilizada para o mapeamento de genes de resistência a doenças provocadas por fungos. A existência de populações de híbridos interespecíficos, com progenitores definidos, possibilitará igualmente o estabelecimento de padrões moleculares característicos das três espécies, possibilitando a ulterior caracterização das populações existentes de castanheiro no que diz respeito à sua identidade genética. Esta ferramenta molecular permitirá igualmente testar e seleccionar castanheiros em idades jovens, em relação à

resistência ou susceptibilidade à doença da tinta. Será de grande utilidade para a certificação de castanheiros, para implementação de novos parques clonais, em programas de reflorestação, para utilização como porta enxertos a utilizar no sistema de exploração frutícola e ainda para fornecimento a agricultores e viveiristas nacionais. As técnicas moleculares utilizadas possibilitarão igualmente a avaliação da variabilidade das populações de castanheiro existentes.

Material e métodos

Polinizações

As polinizações controladas foram realizadas no campo experimental do Vimeiro (Alcobaça), onde existe uma colecção de cultivares de castanheiro de várias proveniências, instalada pela Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade e actualmente sob a jurisdição da Direcção Regional de Agricultura Ribatejo e Oeste (DRARO).

A escolha das cultivares (progenitores femininos) resultou de uma selecção, visando as de maior interesse económico (essencialmente boa qualidade de fruto e boa produção) (VALDIVIESSO, 2000). A escolha dos progenitores masculinos (*Castanea crenata e C. mollissima*) foi baseada na resistência às doenças da tinta e do cancro. A utilização de *Castanea crenata* tem como objectivo a resistência à doença da tinta provocada pelo fungo *Phytophthora cinamomi* Rands e *P. cambivora* (Petri) Buisman e a de *Castanea mollissima* a resistência ao cancro provocado pelo fungo *Cryphonectria parasitica* (Murr) Barr.

À partida deparámo-nos com o problema de este campo experimental apresentar muitas árvores em mau estado vegetativo, devido ao abandono a que foi sujeito (ausência de rega, poda, tratamentos fitossanitários ou qualquer maneio de solo), no entanto, as polinizações foram aí realizadas devido à existência das variedades de maior interesse económico.

Procedeu-se ao isolamento de flores femininas, quando estas começavam a distinguir-se na base das inflorescências mistas, mesmo antes do aparecimento dos estigmas (Ff) (VALDIVIESSO *et al.*, 1993) (Figura 1 e 1a). Os isolamentos foram feitos com sacos de papel vegetal que têm porosidade, permitindo algum arejamento mas não permitem a contaminação polínica, ou seja a entrada de pólen dentro dos sacos.

Nos raminhos a isolar retiraram-se os amentilhos masculinos e a zona do amentilho portadora de inflorescências masculinas (Figura 2 e 2a).

Procedeu-se à ablação de metade da superfície foliar, por se verificar que este procedimento era necessário para diminuir a humidade dentro dos sacos (Figura 3). Na zona de fecho dos sacos (seta na figura 4) foi colocado algodão hidrófilo entre o ramo e o saco para aumentar o arejamento.

Os amentilhos, portadores de flores masculinas, foram colhidos no início da deiscência do pólen, mantidos à temperatura ambiente, sendo o pólen recolhido à medida que ia sendo libertado, desidratou-se num excicador com sílica gel e foi conservado por congelação, numa câmara a -80ºC.

Quando atingiram a plena receptividade, as flores femininas, foram polinizadas com o pólen conservado ou fresco, consoante as espécies utilizadas como progenitoras masculinas apresentam florações protândricas ou homogâmicas.

Figura 1 – Raminho portador de inflorescência feminina no estado Ff (seta)

Figura 1a – Pormenor do raminho portador de inflorescência feminina

Figura 2 – Flor feminina preparada para o isolamento após terem sido retiradas as inflorescências masculinas (seta)

Figura 2a – Pormenor da inflorescência feminina

Figura 3 – Ablação dos folíolos dos raminhos antes de serem isolados

Figura 4 – Saco de isolamento

Como foram utilizadas 4 variedades de *C. sativa* como progenitoras femininas (Longal, Judia, Carreiró e Martainha), as polinizações foram escalonadas de acordo com a plena receptividade de cada variedade. Ainda, com o objectivo de aumentar a percentagem de vingamento, foram feitas várias polinizações (2 a 3) nas mesmas flores, uma vez que estigmas que cada flor possui (em média 6) não estão receptivos simultaneamente, mas sim sequencialmente (FEIJÓ *et al.*, 1999; VALDIVIESSO, 1999). Depois da polinização os sacos foram selados (Figura 4)

Análise molecular

Foi extraído o DNA dos progenitores e respectiva descendência, utilizando o kit de extracção DNeasy Plant Mini Kit da Quiagen. Cada amostra foi amplificada com 6 pares de primers de microssatélites nucleares para 6 loci diferentes CsCAT 2-34-41 (MARINONI *et al.*, 2003) desenvolvidos para *Castanea sativa* ou QPZAG 1-36-110 (STEINKELLNER *et al.*, 1997) desenvolvidos para *Quercus petrae*.

As reacções de amplificação por PCR foram realizadas num volume final de 25 µl contendo 2.5 mM de MgCl2, 0.2 mM de cada dNTP, 5 µM de cada primer, 0,5 U de Taq DNA polymerase, tampão de reacção 1x concentrado e 20 ηg de DNA. O primer forward foi marcado com um de dois fluorocromos diferentes: NED--amarelo e FAM – azul. O programa de PCR foi optimizado para cada primer. Após amplificação os fragmentos foram desnaturados com formamida e foram separados por electoforese capilar usando o sequenciador ABI PRISM 310. Como marcador de tamanho foi utilizado ROX, marcado com o fluorocromo encarnado. A detecção foi feita por laser.

Resultados

Polinizações

O número de sacos de isolamentos em cada progenitor encontra-se no Quadro 1, sendo de referir que cada isolamento contém em média duas inflorescências e cada inflorescência tem 3 flores. Assim, para o total de 68 sacos de isolamentos, polinizaram-se cerca de 408 flores.

Quadro 1 - Número de sacos de isolamento colocados em cada árvore por cultivar e progenitor masculino utilizado

♀			♂			
Cutivar	**Árv. nº**	**Nº sacos de isolamentos/árv.**	***C. crenata* 1**	***C. crenata* 3**	***C. mollissima***	**Total**
Martainha 2	1	3	22			22
	2	11				
	8	8				
Longal 0	2	9			20	20
	3	11				
Judia	4		4			4
Carreiró	22			22		22
Total			26	22	20	**68**

Em meados de Julho todos os sacos de isolamento foram retirados, para favorecer o desenvolvimento dos frutos (Figura 5). Todos os raminhos foram identificados com uma etiqueta que continha a identificação dos progenitores.

Em meados de Setembro foram colocados sacos de manga de rede para evitar que, aquando da maturação dos ouriços e abertura das valvas, se perdessem os frutos por deiscência.

Em Novembro foram colhidos os frutos resultantes das polinizações controladas. Dos 68 sacos de isolamentos (408 flores) foram colhidos 21 frutos, que representam cerca de 5% de vingamento (Quadro 2)

Os frutos assim obtidos foram germinados numa câmara de crescimento (ARALAB) com uma temperatura de 20ºC, fotoperíodo de 16 horas de luz e humidade relativa de 60%, utilizando-se como substrato areia esterilizada. A germinação ocorreu ao fim de 15 dias, após o que as plântulas foram colocadas em vaso e colocadas em estufa (Figura 6)

Só se obtiveram plantas de um cruzamento, Carreiró x *C. crenata* 3. De 15 sementes obtidas deste cruzamento 11 germinaram (Quadro 3). De nenhum dos outros cruzamentos foi possível obter plantas embora se tivessem obtido frutos, estes não germinaram.

Figura 5 – Ouriços já formados após polinização

Figura 6 – Plantas da geração F1 6 meses após germinação

Quadro 2 - Número de sacos de isolamentos, flores e de frutos obtidos por cada cruzamento efectuado

Cruzamento	Nº isolamentos	Nº de flores	Nº de frutos obtidos
Carreiró x *C. crenata* 3	22	132	15
Judia x *C. crenata* 1	4	24	3
Martainha 2 x *C. crenata* 2	22	132	2
Longal 0 x *C. mollissima*	20	120	1
Total	68	408	21

Quadro 3 - Número de frutos obtidos / número de plantas por cada cruzamento efectuado

	***C. crenata* 3**	***C. crenata* 1**	***C. crenata* 2**	***C. mollissima***
Carreiró	15/11			
Judia		3/0		
Martainha 2			2/0	
Longal 0				1/0

Análise molecular

Na figura 7 apresentam-se os alelos para o locus QPZAG 36 marcado com flurocromo azul, para o único cruzamento em que foi possível obter descendência (*Castanea sativa* cultivar Carreiró x *C. crenata* 3) para o locus QPZAG36, marcado com fluorocromo azul. Foram obtidos dois alelos para cada indivíduo e observa-se a segregação dos alelos na descendência. Nos cinco painéis estão representados respectivamente os alelos do progenitor feminino, *Castanea sativa* cultivar Carreiró (217:219), do progenitor masculino *C. crenata* 3 (205:219) e de 3 indivíduos da descendência: o primeiro heterozigótico com dois alelos de tamanho (217:219) o segundo heterozigótico (205:219) e o terceiro homozigótico (219:219).

Discussão

Os microssatélites nucleares são muito úteis para estudos de genética de populações e de mapeamento de genes, devido à sua característica de codo-minância e elevada reprodutibilidade. Por outro lado, os microsatélites são muito conservados em determinados géneros e até famílias. No presente estudo os microssatélites desenvolvidos para o género *Quercus*: QPZAG 1, 36 e 110 (STEINKELLNER *et al.*, 1998) funcionaram muito bem em *Castanea sativa*, *C crenata* e *Castanea mollissima*, espécies da família *Fagaceae*, até melhor do que alguns microssatélites desenvolvidos para *Castanea sativa* (CsCAT) (MARINONI *et al.*, 2002) que, em alguns casos, amplificaram duas bandas por alelo.

Iniciámos as polinizações controladas para o estabelecimento de uma família de pedigree, obtida entre progenitores com características contrastantes no que respeita à resistência à tinta. A baixa taxa de vingamento obtida, bem como o facto de só ter sido possível obter plantas de um único cruzamento, Carreiró x *C. crenata* 3, com o número de indivíduos F1 obtidos (11) manifestamente reduzido, foi devido a problemas fisiógicos das árvores, causados pelo abandono do campo de variedades nomeadamente: ausência de rega, poda, tratamentos fitossanitários ou qualquer maneio de solo. Assim, o trabalho será prosseguido com o desenvolvimento de novas polinizações entre os progenitores Carreiró x *C crenata* 3, para aumentar o nº de indivíduos F1, aos quais serão ulteriormente aplicados 3 tipos de marcadores moleculares: Microsatélites, AFLPs e RAPDs para o mapeamento dos genes de resistência aos fungos responsáveis pelas doenças do castanheiro. Já foi construído um mapa genético em *Castanea sativa,* baseado em RAPD, ISSR e isoenzimas, para identificação de QTLs relacionados com a resistência à geada (CASASOLI *et al.*, 2001).

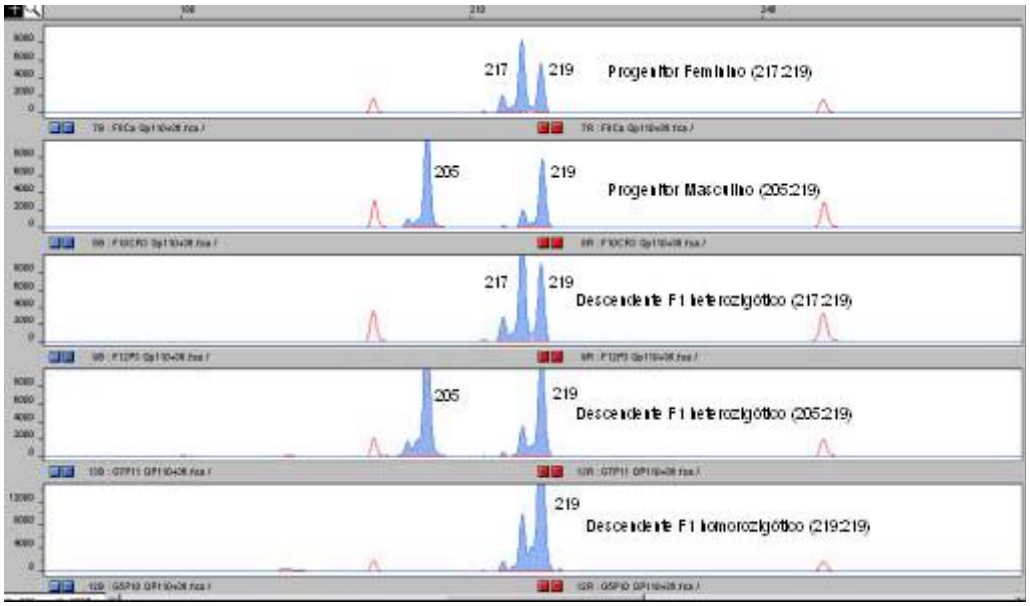

Figura 7 – Segregação dos alelos para o locus QPZAG36. Painel 1: Progenitor feminino, painel 2: Progenitor masculino, painéis 3, 4 e 5 – descendência

Agradecimentos

Agradece-se a colaboração prestada pela Engª Maria de Lourdes Santos (Responsável pelo laboratório de sementes da EFN) na germinação das sementes.

Este estudo foi financiado pelo projecto Piddac 232.

Bibliografia

CASASOLI, M., MATTIONI, C., CHERUBINI, M., VILLANI, F., 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* **102** : 1190–-1199.

FEIJÓ, J.A., CERTAL, A.C., BOAVIDA, L., VAN NERUM, I., VALDIVIESSO, T., OLIVEIRA, M.M., BROOTHAERTS, W., 1999. Advances on the study of sexual reproduction in the cork tree (*Quercus suber* L)., Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and in Rosaseae (Apple and Almond) M. Cresti. G.Cai . A. Modscatelli (Eds). *Chapter* **26** : 76-396.

STEINKELLNER, H., FLUCH, S., TURETSCHEK, E., STREIFF, R., KREMER, A., BURG, K., GLOSS, J., 1997. Identification and characterization of (GA/CT) n – Microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology* **33** : 1093-1096.

MARINONI, D., AKKAK, A., BOUNOUS, G., EDWARDS, K.J., BOTTA, R., 2003. Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill). *Molecular Breeding* **11** : 127-136.

VALDIVIESSO, T., MEDEIRA, C., PINTO DE ABREU, C., 1993. Contribution for the study of the chestnut floral biology. Proceedings of the International Congress on Chestnut. *Spoleto* (Italy) Oct. **93** :95-97.

VALDIVIESSO, T., 1999. Estudo Sobre a Reprodução Sexuada e Caracterização de Cultivares de *Castanea sativa* Mill. Dissertação apresentado às provas de acesso à categoria de Investigador auxiliar. INIA.

VALDIVIESSO, T., 2000. Caracterização de Cultivares de *Castanea sativa* Mill. *Silva Lusitana* **8**(2) : 195-213.

Entregue para publicação em Março de 2004
Aceite para publicação em Outubro de 2005