



MELHORAMENTO GENÉTICO EM AMORA: OPORTUNIDADES E DESAFIOS

A amora pertence ao género *Rubus*, o qual apresenta diferentes níveis de ploidia, constituindo um dos principais desafios para o seu melhoramento genético. A indução de poliploidia permite duplicar o número de cromossomas das amoras silvestres e em simultâneo obter plantas com frutos, flores e folhas maiores e menos suscetíveis a doenças.

Manuel F. Roque^{1,2}, Teresa Valdivieso², Cândida S. Trindade², Mariana Mota³, Pedro B. Oliveira^{2,3}

¹ Madre Fruta



² Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



³ Laboratório associado TERRA, Centro de investigação LEAF - Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, ISA, Universidade de Lisboa



A amora (*Rubus* L. subgénero *Rubus* Watson) é uma cultura bastante apreciada pelos consumidores devido ao seu sabor, aspeto visual e benefícios para a saúde^[1] e pelos produtores devido ao seu alto valor de mercado. Em Portugal, entre 2017 e 2021, as exportações aumentaram de 4,5 para 21,9 milhões de euros^[2]. O melhoramento genético de amora progrediu substancialmente nos últimos 100 anos, com mais de 400 variedades patenteadas, originárias de seleções de amora silvestre^[3]. Os endemismos de amora silvestre são um recurso genético valioso, uma vez que possuem características únicas, como alto valor nutricional, resistência a pragas e doenças e atributos desejáveis na qualidade dos frutos^[4]. Recentemente, a equipa de Pequenos Frutos do INIAV estudou e caracterizou as melhores espécies de amoras endémicas e ecótipos de *R. ulmifolius* existentes em Portugal (Figura 1), um dos países com maior diversidade de endemismos de amora silvestre^[4,5].

Nos próximos quatro anos realizar-se-á uma investigação aprofundada sobre esta temática, com os objetivos de a) introduzir endemismos de amora silvestre no programa de melhoramento genético de amora em curso, através da indução de poliploidia; b) realização de cruzamentos interespecíficos entre poliploides de amoras silvestres e variedades comerciais de amoras, visando a obtenção de novas variedades comerciais portuguesas com características únicas e de valor acrescentado; c) estudar os problemas que podem resultar de cruzamentos interespecíficos de poliploides (incompatibilidade gametofítica, apomixia e esterilidade floral) e d) estudar a transmissibilidade de caracteres resultan-



Figura 1 – Ecótipo de *Rubus ulmifolius* (A – silvado; B – lateral frutífero; C – folha).

tes das hibridações por genotipagem, fenotipagem, produtividade e avaliação sensorial/nutricional. Espera-se que estes estudos conduzam a um enriquecimento do programa de melhoramento atual com um maior nível de diversidade genética e contributo científico, criando material de *pre-breeding* que permita acelerar o desenvolvimento de novas cultivares comerciais.

A germinação de sementes (Figura 2) e a indução de poliploidia estão entre os principais desafios de um programa de melhoramento genético de amora, uma vez que as sementes apresentam dupla dormência (endógena e exógena)^[6] e os genótipos podem ter diferentes níveis de ploidia^[7]. A germinação *in vitro* tem sido utilizada no melhoramento de *Rubus* com o objetivo de aumentar a taxa de germinação e obter plantas rapidamente^[8]. A poliploidia tem um papel preponderante na evolução das fruteiras, sendo a sua indução artificial uma ferramenta essencial no melhoramento genético^[9]. Conhecer o nível de ploidia de cada genótipo é essencial para prever o sucesso dos cruzamentos e obtenção de híbridos viáveis. Genótipos com diferentes níveis de ploidia têm sido patenteados e lançados como variedades^[10]. Diferentes técnicas têm sido aplicadas para induzir poliploidia: radiação, choques de temperatura, lesão de células meristemáticas, inibição da redução meiótica na produção do grão de pólen e tratamentos químicos (colchicina, orizalina, trifluralina)^[9]. A indução de poliploidia em endemismos

de amora permite desenvolver características vantajosas que podem beneficiar programas de melhoramento e expandir a sua diversidade genética^[4]. A citometria de fluxo é o método mais utilizado para determinar o nível de ploidia em plantas^[11]. Para a obtenção de híbridos que conjuguem as melhores características é essencial realizar polinizções controladas (Figura 3). No entanto, existem inúmeros desafios. Por um lado, os decorrentes da indução da poliploidia, principalmente relacionados com a esterilidade floral, por outro, a tendência natural para a apomixia e incompatibilidade gametofítica^[11].

No melhoramento, a seleção dos genótipos híbridos é realizada em função das características pretendidas através de ensaios agronómicos de larga escala. A expressão fenotípica é influenciada por diferentes mecanismos genéticos, sendo muitas vezes difícil e subjetiva a sua avaliação no campo. A seleção assistida por marcadores moleculares e a fenotipagem de plantas são fundamentais. Embora a fenotipagem de alto rendimento em plantas (HTPP) realizada através do tratamento de imagens esteja a surgir com alguma expressão^[12], a fenotipagem clássica com recurso à observação humana (características de crescimento, morfologia, arquitetura da planta, grau de resistência a pragas e doenças, produtividade, qualidade e outras) é uma metodologia utilizada em fases iniciais de programas de melhoramento. Para o registo de novas variedades, os genótipos têm de ter características obrigatoriamente distintas, uniformes e estáveis^[13]. Usualmente, os programas de melhoramento de amora visam a obtenção de novas variedades com alta produtividade, elevado calibre e qualidade dos frutos, resistência a pragas e doenças, adaptabilidade a condições adversas, *shelf-life* e ausência de reversão da cor^[3,11].

A utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento^[14] contribui para a avaliação da diversidade genética e seleção assistida em algumas das características de interesse, sendo uma vantagem na análise da heritabilidade das descendências e correlação das diferentes características avaliadas nos ensaios de campo^[15].

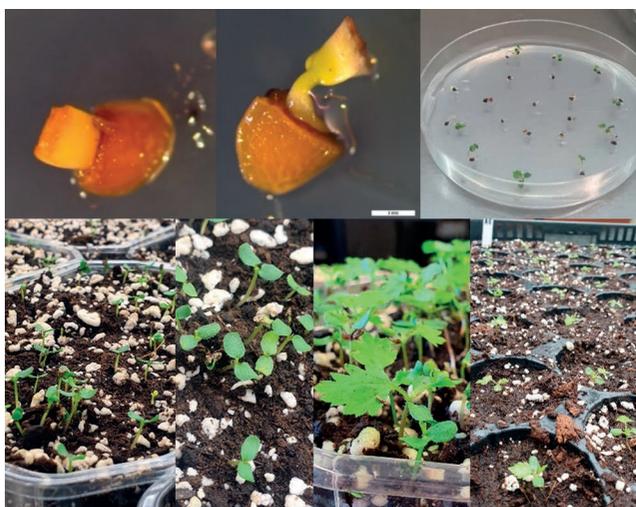


Figura 2 – Germinação *in vitro* (cima) e *ex vitro* (baixo).



Figura 3 – Etapas de execução das polinizações controladas (1 – estado fenológico ótimo para a realização dos isolamentos; 2 – remoção dos estames (emasculação); 3 – flor emasculada; 4 – sacos de isolamento colocados nas flores emasculadas; 5 – estigmas recetivos; 6 – polinização artificial; 7 – reisolamento após aplicação de pólen; 8 – inchaço dos ovários (óvulos fecundados); 9 – Frutos vingados; 10 – Colheita do fruto maduro para extração da semente híbrida.

Enquadramento da investigação a desenvolver

A investigação a desenvolver insere-se num dos mais recentes projetos do INIAV/Madre Fruta, o melhoramento genético de amora, e será realizada no âmbito de uma bolsa de doutoramento FCT (submetida à Fundação para a Ciência e Tecnologia). O principal objetivo é obter novas variedades portuguesas altamente produtivas, adaptadas às condições climáticas do sudoeste Alentejano e Algarve e aos sistemas de produção utilizados em Portugal. Este programa de melhoramento, iniciado em janeiro de 2021, resulta de uma parceria estabelecida através de um protocolo entre a Organização de Produtores Madre Fruta e o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.). Mais recentemente, conta com a colaboração científica da Università Politecnica delle Marche (UNIVPM), de Itália. O programa conta com um campo experimental, já estabelecido no Polo de Inovação da Fataca – PIF

(INIAV, I.P.), onde se selecionam os primeiros génotipos obtidos e se encontra a coleção varietal e com um alargado banco de sementes e génotipos de endemismos de amoras silvestres, no INIAV, I.P., em Oeiras.

Objetivos

Os principais objetivos desta linha de investigação são:

1. Otimização dos protocolos de germinação de sementes *in vitro* e *ex vitro*. Indução de poliploidia nas espécies endémicas de amora da coleção do INIAV para obtenção de material *pre-breeding* que transmita novas características desejadas;
2. Estudo da incompatibilidade gametofítica, apomixia e esterilidade floral, desafios a superar na realização dos cruzamentos interespecíficos entre amoras silvestres poliploides e variedades comerciais;
3. Estudo da heritabilidade genética das novas características identificadas nas seleções poliploi-

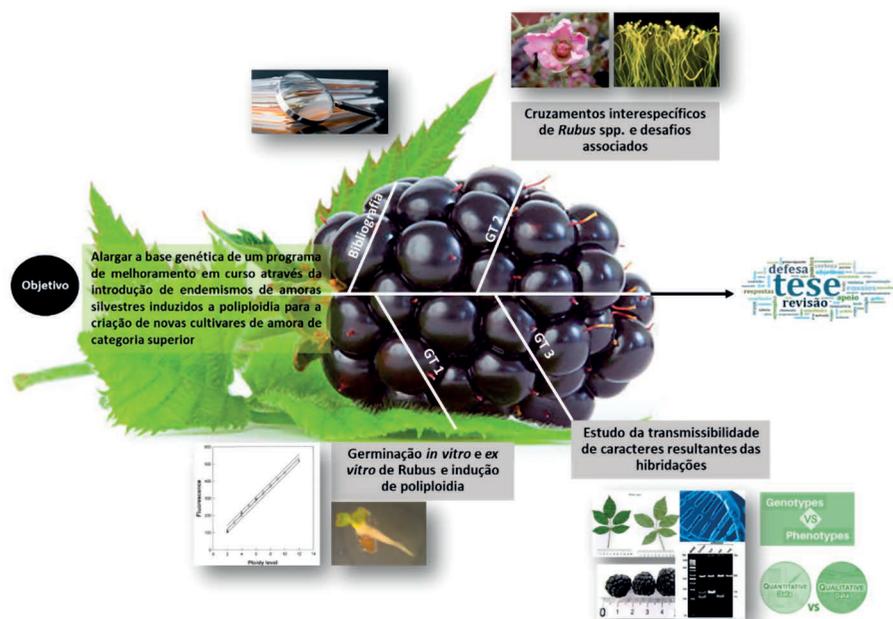


Figura 4 – Esquema dos trabalhos a desenvolver.

des, combinando a caracterização genotípica e fenotípica dos novos híbridos, incluindo resiliência da planta, rendimento e qualidade sensorial/nutricional dos frutos.

Metodologia

Neste projeto de investigação, uma nova base genética será introduzida no programa de melhoramento de amora através da introdução de espécies endêmicas de *Rubus* após indução à poliploidia, permitindo a ampliação da diversidade genética e o desenvolvimento de novas cultivares únicas de categoria superior. Esta proposta está dividida em 3 grupos de trabalho (GT) (Figura 4):

- **GT1. Desenvolvimento de protocolos de germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes endêmicas de *Rubus* e indução de poliploidia**

O principal objetivo é introduzir espécies endêmicas portuguesas no programa de melhoramento. As sementes serão germinadas e as plântulas induzidas à poliploidia. As seguintes tarefas serão realizadas para otimizar a germinação de sementes de *Rubus*/indução de poliploidia: Germinação *ex vitro*, Germinação *in vitro*, Indução de poliploidia e Citometria de fluxo.

- **GT2. Cruzamentos interespecíficos de *Rubus* spp. e desafios associados**

O principal objetivo é superar os desafios relacionados com os cruzamentos. Várias abordagens serão utilizadas: Hibridações, Incompatibilidade polínica, Apomixia e Esterilidade da F1 (Figura 5).

- **GT3. Estudo da transmissibilidade de caracteres**

O principal objetivo é estabelecer um critério robusto de geno-fenotipagem de plantas e avaliar a produtividade e a qualidade dos frutos: Fenotipagem, Genotipagem e Avaliação da produção e análise sensorial/nutricional dos frutos.

Conclusões

Esta investigação pretende contribuir e valorizar cientificamente o programa de melhoramento através do alargamento da base genética para a obtenção de novo material de *pre-breeding*. Este material permitirá transmitir novas características fundamentais, e as novas tecnologias a implementar permitirão acelerar a obtenção de novas variedades portuguesas de amora. Os vários resultados desta investigação permitirão ultrapassar as condicionantes inerentes à obtenção de híbridos e maximi-

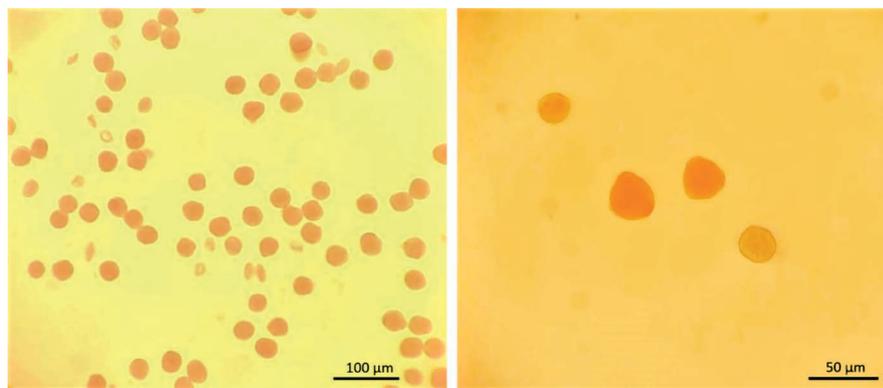


Figura 5 – Grãos de pólen observados à lupa (esquerda – ampliação 10x; direita – ampliação 40x).

zar e otimizar a avaliação de campo e laboratorial. Finalmente, o principal objetivo a alcançar com estas linhas de trabalho é a obtenção de novas variedades de amora de categoria superior com características únicas e de valor acrescentado, altamente adaptadas às nossas condições climáticas e aos sistemas produtivos de Portugal. 🌱

Referências Bibliográficas

- [1] Cosme, F. et al. (2022). Red Fruits Composition and Their Health Benefits – A Review. *Foods*, **11**:644.
- [2] GPP – Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (2023). Informação sobre produtos: Amora/Groselha.
- [3] Clark, J.R.; Finn, C.E. (2011). Blackberry Breeding and Genetics. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, **5**:27–43.
- [4] Giampieri, F. et al. (2018). Phytochemical Composition and Cytotoxic Effects on Liver Hepatocellular Carcinoma Cells of Different Berries Following a Simulated In Vitro Gastrointestinal Digestion. *Molecules*, **23**:1918.
- [5] Valdivieso, T. et al. (2022). Espécies endémicas – As amoras silvestres e as camarinhas. In: Nunes, A.; Trindade, C. S.; Palha, M. G.; Oliveira, P. B.; Valdivieso, T. (Eds.), *Tecnologias de produção de pequenos frutos para produção fora de época*. INIAV, I.P., Oeiras, Portugal, 87–100.
- [6] Wada, S. et al. (2011). Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. *Scie. Hort.*, **130**(4):762–768.
- [7] Sabooni, N. et al. (2022). Successful polyploidy induction and detection in blackberry species by using an in vitro protocol. *Scie. Hort.*, **295**:110850.
- [8] Pergolotti, V. et al. (2023). Standardization of an In Vitro Seed Germination Protocol Compared to Acid Scarification and Cold Stratification Methods for Different Raspberry Genotypes. *Horticulturae*, **9**:153.
- [9] Dar, T.-Ul.-H.; Rehman, R.-Ul. (2017). Origin of Polyploidy. In: Dar, T.-Ul.-H.; Rehman, R.-Ul. (Eds.), *Polyploidy: Recent Trends and Future Perspectives*. Springer, New Delhi, India. pp. 15–29.
- [10] Finn, C.E.; Clark, J.R. (2017). Cultivar Development and Selection. In: Hall, H.K.; Funt, C. (Eds.), *Blackberries and Their Hybrids*, CABI, Preston, UK, 63–93.
- [11] Meng, R.; Finn, C. (2002). Determining Ploidy Level and Nuclear DNA Content in *Rubus* by Flow Cytometry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **127**(5):767–775.
- [12] Carvalho, L.C. et al. (2021). Potential Phenotyping Methodologies to Assess Inter- and Intra-variety Variability and to Select Grapevine Genotypes Tolerant to Abiotic Stress. *Front. Plant Sci.*, **12**:718202.
- [13] Wang, Y. et al. (2022). Phenotyping in flower and main fruit traits of Chinese cherry. *Scientia Horticulturae*, **296**:110920.
- [14] Lewers, K.S. et al. (2008). A blackberry (*Rubus* L.) expressed sequence tag library for the development of simple sequence repeat markers. *BMC Plant Biol.*, **8**:69.
- [15] Aneja, B. et al. (2012). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Mol. Breeding*, **30**:1635–1648.