

## Avaliação de ecótipos em *Rubus ulmifolius* Schott

Francisco R. Luz<sup>1</sup>, Teresa Valdivieso<sup>1</sup> & Pedro B. Oliveira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INIAV, I.P., UEIS-SAFSV, Av. da Republica Nova-Oeiras, 2784-505, Oeiras

<sup>2</sup>LEAF- Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda 1349-017, Lisboa

### Resumo

A espécie *Rubus ulmifolius* Schott apresenta um amplo número de formas transitórias dispersas por todo o território português, onde também se encontram diversas espécies endémicas de amoras silvestres. O INIAV possui uma coleção de endemismos ibéricos de *Rubus* spp.. Existem nesta coleção diferentes ecótipos de *Rubus ulmifolius* selecionados e colhidos pelo seu possível interesse frutícola. Verificou-se a existência de um ecótipo de *R. ulmifolius* com características de vigor vegetativo e de frutificação superiores aos restantes. Foram estudados quatro ecótipos de *R. ulmifolius*, Arripiado, Serpa, Barrancos e Fataca. Destas plantas foram colhidos frutos e analisados os seguintes parâmetros biométricos: forma do fruto (eixos longitudinal e transversal); número, peso fresco e seco de 100 g de frutos; número e peso fresco e seco das sementes por fruto. Foram recolhidas amostras foliares para se fazer uma análise comparativa da dimensão do genoma dos diferentes ecótipos por citometria. Os resultados revelaram diferenças consideráveis nos parâmetros biométricos. O ecótipo Arripiado apresentou os frutos com maior peso (46-53 % a mais no peso fresco que os restantes) e número de sementes (28-51 % mais sementes que os restantes). Este ecótipo apresenta um eixo longitudinal maior que o transversal, conferindo-lhe uma forma alongada, com os frutos dos outros ecótipos a apresentarem uma forma mais arredondada. A avaliação citométrica revelou que não existem diferença na dimensão entre os genomas nestes quatro ecótipos de *R. ulmifolius*. Dos quatro ecótipos apenas o Arripiado poderá ter alguma potencialidade frutícola, sendo de afastar um grau superior de polimorfismo como explicação para o aumento considerável das características biométricas analisadas. Deverão ser feitos estudos morfológicos no sentido de determinar se estamos perante uma forma botânica distinta de *Rubus ulmifolius*. O ecótipo Arripiado apresenta um potencial interessante para integrar um programa de melhoramento de amoras mantendo o caráter silvestre.

**Palavras-chave:** amoras silvestres, citometria de fluxo, pequenos frutos

### Abstract

#### Evaluation of ecotypes in *Rubus ulmifolius* Schott

*Rubus ulmifolius* Schott is a species with a wide range of transitory forms that are dispersed throughout the Portuguese territory, where it can also be found a diverse number of other endemic wild blackberries. INIAV has a germoplasm collection of *Rubus* spp. endemic form the Iberian Peninsula. Different ecotypes of *Rubus ulmifolius*, selected and collected by their possibly interesting fruit characteristics, can be found at this collection. One of these ecotypes showed vegetative vigour and fruiting traits superior than the others. Four ecotypes of *R. ulmifolius* – Arripiado, Serpa, Barrancos and Fataca – were studied. Fruit biometric parameters were measured: shape of the fruit (longitudinal and transversal axes); number of fruits, fresh and dry weight of fruit samples of 100 g; number and fresh and dry weight of seeds per fruit. Leaf samples of the different ecotypes were taken for comparative cytometry analyses of the genome size. Results revealed considerable differences in the biometric parameters. The ecotype Arripiado presented the fruits with the highest values in weight (46-53 % more fresh weight) and number of

seeds (28-51 % more seeds) compared with the other ecotypes studied. Arripiado fruits have an elongated shape, with the longitudinal axis longer than the transversal axis, whereas the fruits from the other ecotypes presented a more rounded like shape. Flow cytometry revealed no differences in genome size of the four ecotypes of *R. ulmifolius*. Arripiado was the only ecotype, among the four, that may have some potential regarding the fruit biometric traits, although a higher degree of polyploidy cannot explain its considerable increase in these fruit traits compared with the other ecotypes. Morphological studies may take place to determine if this ecotype is a distinct botanical form of *R. ulmifolius*. Arripiado ecotype presents an interesting potential to be regarded in breeding programs for wild blackberries traits.

**Keywords:** wild blackberries, flow cytometry, small fruits

### Introdução

O género *Rubus* é um táxon muito grande que apresenta uma grande distribuição mundial, encontrando-se espécies em todos os continentes, desde as regiões tropicais às regiões árticas. O número exato de espécies é desconhecido. Contudo estima-se que existam entre 600 e 800 espécies. Desacordos entre taxonomistas sobre as espécies deste género são comuns devido à existência de hibridações interespecíficas, poliploidia e formas de apomixia que por vezes geram confusões na sua classificação, levando a fronteiras entre espécies pouco definidas. Muitas destas espécies são fonte de alimento, produzindo frutos que são explorados comercialmente como as framboesas e as amoras, para além de haver, tradicionalmente, colheita de frutos em plantas de silvados.

Na Península Ibérica pode-se encontrar um elevado número de espécies silvestres. Mais de uma dezena destas espécies estão presentes no Norte e Centro de Portugal, em maior número na região de Trás-os-Montes e Alto Douro. Segundo Franco (1971) a espécie *Rubus ulmifolius* é de longe a mais comum, e a única encontrada no Sul de Portugal. Aparece em clareiras e orlas de bosques (azinheiras, pinheiros, carvalhos e faias) bordas de caminho, limites de linhas de água, barrancos; em solo mais ou menos húmido, tanto silicioso quanto calcário, preferencialmente em zonas mais ou menos quentes e secas, a altitudes entre os 0 e 1700 m. Pode ser encontrada a Oeste da Europa, desde a Península Ibérica e Ilhas Britânicas até ao Sul da Holanda e Sudoeste da Alemanha, Itália, Península Balcânica, ilhas do Mediterrâneo, Noroeste de África e Macaronésia (Monasterio-Huelin, 1988).

É uma espécie extremamente polimórfica na qual estão descritos numerosos táxones que se diferenciam na forma do folíolo terminal, pela cor das pétalas, pela presença ou não de pelos simples no eixo floral. Tanta variabilidade é devida às condições ambientais e à capacidade desta espécie em gerar híbridos pouco estáveis (Monasterio-Huelin, 1988).

O interesse e atenção nos recursos silvestres, como as amoras de silva, tem vindo a crescer nos últimos anos uma vez que estão a ser descobertos e publicados trabalhos que provam a existência de compostos benéficos para a saúde humana nos frutos destas espécies (Santos *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2012).

Na Herdade Experimental da Fataca do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), tem-se vindo a estabelecer uma coleção de endemismos de espécies de amoras silvestres com plantas colhidas um pouco por todo país. Uma vez que a espécie *R. ulmifolius* tem uma larga distribuição em território nacional, colheram-se vários genótipos de silvados em regiões diferentes. Como se observaram diferenças entre estes ecótipos de *R. ulmifolius* presentes na coleção e porque um destes genótipos apresentava características de vigor vegetativo e de frutificação potencialmente interessantes para possível aproveitamento frutícola ou inclusão em programas de

melhoramento genético, decidiu-se fazer uma análise mais profunda aos parâmetros biométricos do fruto tendo-se também realizado uma análise de citometria aos genótipos para despistes de um possível cenário de poliploidia.

### **Materiais e Métodos**

Foram estudados 4 ecótipos de *R. ulmifolius*, colhidos em quatro regiões do Alentejo, Arripiado, Serpa, Barrancos e Fataca. Destas quatro regiões, colheu-se um genótipo de um silvado. Estes foram multiplicados por estaca lenhosa e instalados no solo na Herdade Experimental da Fataca, em 2013, onde se plantaram 14 plantas de cada genótipo, num compasso de 2,0 x 1,5 m, tendo-se assim juntado às restantes amoras silvestres presentes na coleção de espécies endémicas, colhidas um pouco por todo território nacional.

No verão de 2015, procedeu-se à colheita de frutos destes quatro ecótipos tendo-se feito registos de parâmetros biométricos: forma do fruto, com medições dos eixos longitudinal e transversal de 40 frutos; número e pesos fresco e seco de 100 g de frutos (5 réplicas por ecótipo). Analisaram-se ainda as sementes, numa amostra de 10 frutos, tendo-se registado o peso do fruto e número e pesos fresco e seco das sementes por fruto.

Numa tentativa de explicar as diferenças que se observavam entre as características dos frutos do ecótipo do Arripiado e os restantes ecótipos, procedeu-se a uma análise comparativa da dimensão do genoma dos diferentes ecótipos por citometria a partir de amostras foliares recolhidas na coleção, para se analisar a hipótese de poliploidia deste ecótipo relativamente aos restantes. O genoma conhecido que se utilizou como comparação foi o do tomate (*Solanum lycopersicum*), tendo-se utilizado o tampão Woody Plant Buffer, e o marcador fluorescente iodeto de propídeo. O citómetro utilizado foi o Cyflow<sup>®</sup>space da Sysmex.

### **Resultados e Discussão**

Analisando os resultados do peso e forma dos frutos (quadro 1), percebem-se diferenças consideráveis do genótipo colhido no Arripiado em relação aos outros genótipos de *R. ulmifolius* colhidos nos outros locais. Os frutos do ecótipo do Arripiado têm 46-53 % mais peso fresco que os outros ecótipos, apresentando das razões mais baixas entre o peso seco e o peso fresco dos frutos, à semelhança do ecótipo de Serpa, o que revela que o peso superior dos frutos frescos do ecótipo do Arripiado está sobretudo associado a um aumento de teor de água no fruto.

Relativamente à forma dos frutos, podemos observar que o ecótipo com a forma mais alongada, com maiores comprimentos ao longo do eixo longitudinal (maior altura que largura) é o Arripiado sendo os frutos do genótipo da Fataca o mais redondo e os frutos dos genótipos colhidos em Serpa e Barrancos ligeiramente achatados (mais largos que altos). Este parâmetro pode vir a ser relevante na perspetiva da valorização comercial de amoras silvestres, uma vez que os consumidores estão mais acostumados a ver amoras com formas mais alongadas que achatadas.

Quanto ao contributo das sementes no peso fresco do fruto (quadro 2), pode-se verificar que o valor mais baixo está associado aos frutos do Arripiado que, embora tenha apresentado maior número médio de sementes por fruto, no conjunto dos genótipos analisados, em proporção, as suas sementes representam uma fatia menor do peso fresco do fruto que os restantes ecótipos. Pode também fazer-se uma relação entre o número médio de sementes por fruto e o número de drupas, tendo desta forma o genótipo do Arripiado sido mais uma vez bastante superior (28-51 % mais drupas que os restantes).

Entre os quatro ecótipos, aqueles que apresentaram maior dispersão de valores nos parâmetros biométricos de peso (quadro 1) e sementes (quadro 2), aqui analisados, foram os ecótipos da Fataca e do Arripiado. Este último, contudo, pode estar relacionado com o

maior tamanho do fruto relativamente aos outros ecótipos (fig. 1). Já o ecótipo Fataca tem um desvio padrão grande no peso do fruto (quadro 1) podendo também apresentar grande variação no tamanho dos frutos (fig. 1). Estas características do ecótipo Fataca são desencorajadoras na perspectiva de inclusão deste genótipo em possíveis programas de melhoramento de amoras silvestres, uma vez que os frutos são pouco uniformes.

Pode então considerar-se que dos genótipos de *R. ulmifolius* colhidos, aquele que apresenta características mais distintas dos restantes nos parâmetros biométricos do fruto é o ecótipo do Arripiado.

Uma vez que nas espécies do género *Rubus*, e em particular na amora, está documentado o aparecimento espontâneo de genótipos poliploides (Gustafsson, 1939; Thompson, 1995; Bautista *et al.*, 2018), analisou-se o tamanho do genoma dos quatro genótipos de *R. ulmifolius*, para se perceber se as características superiores do ecótipo do Arripiado, relativamente aos outros ecótipos (Serpa, Barrancos, Fataca) teriam base num grau de ploidia superior. A citometria realizada não revelou diferenças de tamanho entre os genomas destes quatro ecótipos de *R. ulmifolius*. Descarta-se assim a hipótese de que as características superiores nos parâmetros biométricos do fruto, do genótipo do Arripiado, estarem associadas a um grau superior de ploidia relativamente aos restantes genótipos analisados. Uma vez afastada a hipótese de poliploidismo, outras características genéticas estarão na causa desta diferença. Uma destas características poderá ser o vigor. No genótipo colhido no Arripiado, observou-se um vigor vegetativo muito maior que nas plantas dos outros genótipos de *R. ulmifolius* colhidos noutras zonas do país.

Plantas com características de fruto como aquelas encontradas no genótipo do Arripiado podem ser interessantes no ponto de vista de um potencial aproveitamento comercial de amoras silvestres. Estas características observadas no ecótipo proveniente da zona do Arripiado já foram também observadas noutros locais do país, nomeadamente na zona norte, sugerindo que se pode tratar de uma forma botânica da espécie *R. ulmifolius*, presente em várias regiões do país.

O conhecimento sobre os benefícios que estes frutos silvestres têm para a saúde humana tem sido cada vez mais estudado, tendo-se desenvolvido já trabalhos sobre as espécies de amoras endémicas portuguesas (Trindade *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2016), das quais a espécie *R. ulmifolius* faz parte.

A exploração económica de espécies endémicas de amoras silvestres pode representar uma oportunidade no sector dos pequenos frutos. Atualmente está a começar-se a estudar o potencial frutícola destas espécies, em sistemas convencionais de produção em comparação com cultivares (Omondi *et al.*, 2018).

Tendo tudo isto em conta, estudos de caracterização de parâmetros biométricos e comparação entre genótipos de amoras endémicas passam a ser importantes para que se consigam obter os melhores resultados para aproveitamento frutícola ou em programas de melhoramento (Valdivieso *et al.*, 2018).

## Conclusões

Dos quatro ecótipos de *R. ulmifolius* analisados, apenas o Arripiado parece ter alguma potencialidade frutícola, tendo apresentado frutos maiores, mais pesados, com baixas percentagens de matéria seca, maior número de sementes (drupas) e formas mais alongadas, relativamente aos restantes três ecótipos analisados (Serpa, Barrancos e Fataca). Esta superioridade dos parâmetros biométricos dos frutos, não foi explicada pela hipótese de polimorfismo. Deverão ser feitos estudos morfológicos no sentido de determinar se estamos perante uma forma botânica distinta de *Rubus ulmifolius*. O ecótipo Arripiado apresenta um potencial interessante para integrar um programa de melhoramento de amoras que tenha como objetivo a manutenção do carácter silvestre dos

frutos, no sentido de diferenciar e valorizar o produto, ou para estudos de adaptação a sistemas de produção.

### Referências

- Bautista, G. R., Ledesma, S. D. S., Izquierdo, S. C., Torres, T. C., Medina, J. L., Espinoza, M. A. G. & Núñez, L. M. V. 2018. Polyploidy in wild blackberries (*Rubus* spp L.). *Nova Scientia*, 10 (21), 1-16.
- Franco, J.A. 1971. *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Vol. II
- Gustafsson, Å. 1939. Differential polyploidy within the blackberries. *Hereditas*, 25 (1): 33-47.
- Monasterio-Huelin, E. 1998. *Rubus* L. En S.Castroviejo (Coord. Gral.), *Flora Ibérica*, 6: 16-71. CSIC, Madrid.
- Omondi, K. O., Gesimba, R. M. & Wolukau, J. N. 2018. Growth and Yield Potential of Wild Blackberry (*Rubus* spp.) under Conventional Production Practices in Kenya. *Journal of Experimental Agriculture International*, 26 (6): 1-9.
- Santos, C. N., Tavares, L., Pontes, V., Oliveira, P. & Ferreira, R. B. 2011. Poder antioxidante dos pequenos frutos e seus efeitos benéficos para a saúde humana. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 18: 98-105.
- Sousa, M. B., Ramos, A. C. & Serrano, C., 2016. Amoras silvestres: Caracterização dos frutos. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 26: 269-277.
- Tavares, L., Figueira, I., McDougall, G. J., Vieira, H. L., Stewart, D., Alves, P. M., Ferreira, R. F. & Santos, C. N., 2013. Neuroprotective effects of digested polyphenols from wild blackberry species. *European Journal of Nutrition*, 52(1): 225-236.
- Thompson, M. M. 1995. Chromosome numbers of *Rubus* species at the national clonal germplasm repository. *HortScience*, 30 (7): 1447-1452.
- Trindade, P.V., Sousa, V., Tavares, L., Oliveira, C., Pinto, P., Lima, G., Ferreira, R.B., Aguiar, C., Santos, C.N. & Oliveira, P.B. 2014. Amoras Silvestres, uma nova cultura? Características qualitativas e Bioquímicas. Parte II. *Agrotec*, 10:42-46.
- Valdiviesso, T., Luz, F., Evaristo, I., Nóbrega, F., Trindade, C. S., Trindade, P. & Oliveira, P. B. 2018. Amoras silvestres – Um recurso natural a explorar em Portugal. *Vida Rural* 1836: 34-36.

Quadro 1 – Número, peso fresco do fruto e peso seco do fruto médios por cada ecótipo (Arripiado, Serpa, Barrancos e Fataca). Definição da forma dos frutos através do índice de rotundidade (altura/largura), numa média de 40 frutos medidos no maior eixo longitudinal (altura) e no maior eixo transversal (largura). PfF – peso fresco médio do fruto; PsF – peso seco médio do fruto.

	Nº Frutos (em 100 g)	PfF (g)	PsF (g)	PfF/PsF	Índice de Rotundidade (altura/largura)
Arripiado	31 (2,1) <sup>Z</sup>	3,2 (0,24)	0,5 (0,04)	0,16	1,2
Serpa	60 (4,4)	1,7 (0,13)	0,3 (0,02)	0,15	0,9
Barrancos	61 (5,5)	1,7 (0,15)	0,3 (0,04)	0,20	0,9
Fataca	69 (9,8)	1,5 (0,21)	0,3 (0,04)	0,21	1,0

Z – Valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da amostra

Quadro 2 – Relações entre fruto e sementes nos quatro ecótipos (amostras de 10 frutos). PfF – peso fresco médio do fruto, Nº S/F – número médio de sementes por fruto, PfS/F – peso fresco médio das sementes num fruto, PsS/F – peso seco médio das sementes num fruto, PfS/PfF – contributo do peso fresco das sementes no peso fresco do fruto.

	PfF (g)	Nº S/F	PfS/F (g)	PsS/F (g)	PfS/PfF
Arripiado	3,71	78 (15,1) <sup>Z</sup>	0,38 (0,13)	0,11 (0,03)	0,10
Serpa	1,80	38 (5,1)	0,25 (0,04)	0,07 (0,01)	0,14
Barrancos	1,75	56 (7,6)	0,40 (0,08)	0,09 (0,01)	0,23
Fataca	1,85	51 (10,2)	0,38 (0,12)	0,11 (0,03)	0,20

Z – Valores entre parêntesis correspondem ao desvio padrão da amostra

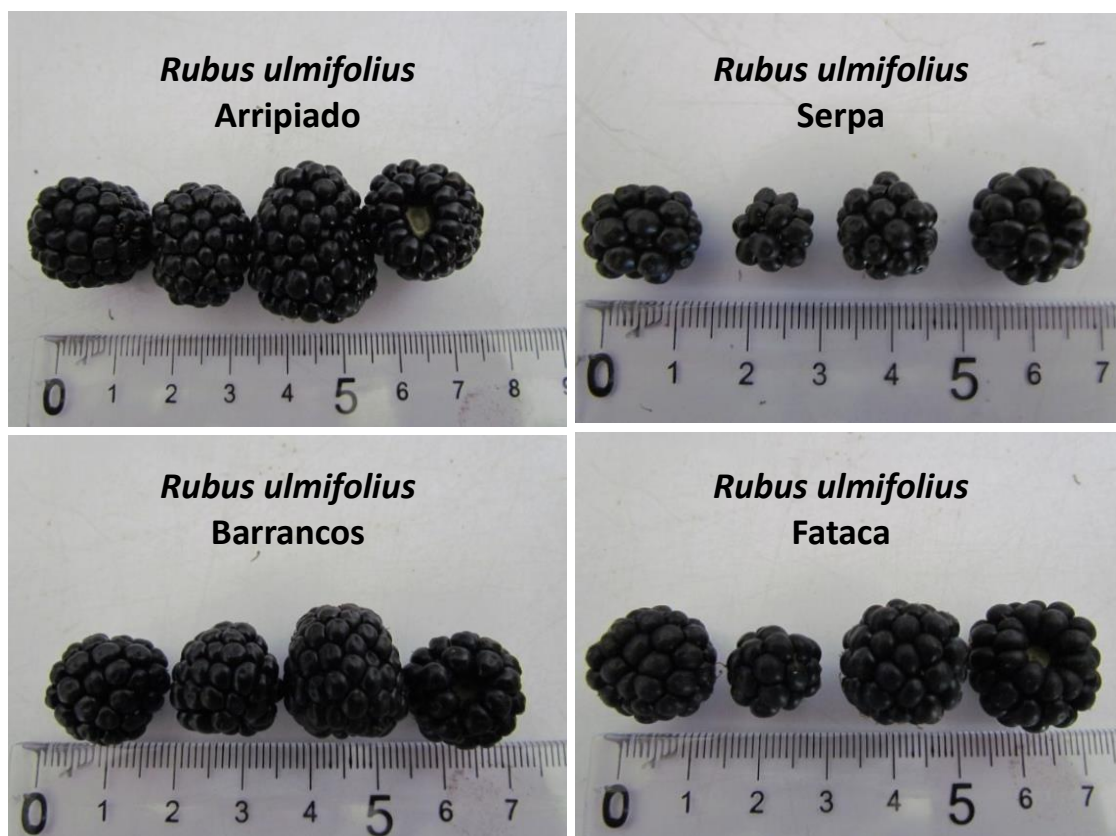


Figura 1 – Frutos maduros dos quatro ecótipos de *Rubus ulmifolius* estudados (Arripiado, Serpa, Barrancos, Fataca).