

Identificação e quantificação de hidratos de carbono nas raízes de mirtilo e framboesa

Fábio André Aparício Gaspar

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica - Hortofruticultura e Viticultura

Orientador(es): Doutora Mariana da Silva Gomes Mota
Doutora Maria do Carmo Martins Serrano

Júri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Pedro Nogueira Brás de Oliveira, Investigador Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária;

Doutora Maria do Carmo Martins Serrano, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Agradecimentos

Aos meus pais, Luísa e Isidro, por todo o apoio, amor incondicional que me dão, o que sou presentemente agradeço a vocês. Tenho um orgulho imenso em ser vosso filho.

À Joana, por toda a ajuda que me deu durante a realização da dissertação, amizade e amor que me tem dado, tenho um orgulho imenso em ser teu namorado.

À Professora Doutora Mariana Mota, pela sua disponibilidade, apoio e preocupação constante ao longo deste trabalho, agradeço de coração o que fez por mim.

Ao Engenheiro Pedro Brás de Oliveira, pela partilha constante de conhecimento e boa disposição que sempre demonstrou para comigo.

À Doutora Carmo Serrano pela paciência que teve comigo durante a realização das análises laboratoriais e pelo conhecimento partilhado na execução do HPLC.

À Professora Doutora Cristina Oliveira pela disponibilidade sempre demonstrada.

À empresa First Fruit e Herdade Experimental da Fataca por disponibilizar respetivamente as plantas de framboesa e mirtilo.

À Anabela pela ajuda na recolha das amostras de mirtilo, à Dona Nídia e Dona Fernanda pelo auxílio dado nos laboratórios e à Dona Paula pela ajuda no liofilizador.

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através da unidade de investigação LEAF- Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (UID/AGR/04129/2013, a quem se agradece.

Por fim agradeço à ESAS e ao ISA pelo conhecimento que me proporcionaram.

A todos um muito OBRIGADO!

Resumo

Em Portugal, a área de pequenos frutos tem aumentado muito nos últimos anos, reflexo do interesse manifestado pelos europeus em consumir frutos com boas características organoléticas e potencialmente vantajosos a nível da saúde, sobressaindo duas culturas, a da framboesa e do mirtilo.

Presentemente, estas culturas beneficiam de tecnologias de produção bastante desenvolvidas baseadas em extensos conhecimentos técnicos. No entanto, existe pouco conhecimento sobre a acumulação de reservas nestas duas culturas, tanto ao nível temporal como da caracterização dos principais açúcares de reserva, o que pode limitar algumas opções fitotécnicas.

Este trabalho visou a identificação e quantificação dos diferentes hidratos de carbono presentes nas raízes de mirtilo e framboesa durante os ciclos reprodutivo e ciclo vegetativo, no período de Março a Dezembro, para permitir compreender e interpretar melhor as suas oscilações nas duas culturas. Para tal, ao longo do ciclo foram colhidas amostras de raízes das duas culturas, que foram depois utilizadas para identificação e quantificação de açúcares de baixo peso molecular, por HPLC, e de amido, por digestão enzimática específica.

Este trabalho revelou preliminarmente a presença de sacarose, glucose, frutose e rafinose (açúcares simples) e de amido nas raízes de mirtilo e framboesa, mostrando-se a sacarose como o hidrato de carbono simples mais abundante nas duas culturas. Nos mirtilos, destacou-se a 'O'Neal', no início da produção, com 71% de sacarose no total de açúcares de baixo peso molecular, enquanto que, nas framboesas, destacou-se a 'Kweli', com 75% de sacarose no final de produção. A percentagem de amido vai sofrendo oscilações com o decorrer do ciclo tanto no mirtilo como na framboesa, apresentando esta teores mais elevados que os mirtilos. Terminada a produção, a variedade de mirtilos 'Paloma' destacou-se com cerca de 11% de amido (na MS), sobressaindo nas framboesas a variedade 'Kweli' com cerca de 12% (na MS).

Palavras-chave: mirtilos, framboesas, raízes, hidratos de carbono, ciclo fisiológico

Abstract

In Portugal, the area of small fruits has increased considerably in recent years, reflecting the interest shown by Europeans in consuming fruits with good organoleptic characteristics and potentially beneficial in health, standing out two cultures, raspberry and blueberry.

Currently, these cultures benefit from highly developed production technologies based on extensive technical expertise. However, there is little knowledge about the accumulation of reserves in these two crops over time and the characterization of the main reserve sugars, which may limit some phytotechnology options.

This work aimed at the identification and quantification of the different carbohydrates present in the roots of blueberry and raspberry during the reproductive and vegetative cycles, from March to December, in order to better understand and interpret their oscillations in the two cultures. Thus, samples of roots of the two cultures were collected throughout the cycle, which were then used for identification and quantification of low molecular weight sugars by HPLC and starch by specific enzymatic digestion.

This work preliminarily revealed the presence of sucrose, glucose, fructose and raffinose (simple sugars) and starch in the roots of blueberry and raspberry, showing sucrose as the most abundant simple carbohydrate in both cultures. In the blueberries, O'Neal at the beginning of the production was highlighted, with sucrose as 71% of total low molecular weight sugars, while in raspberries Kweli, had 75% of sucrose at the end of production. The percentage of starch undergoes oscillations over the course of the cycle in both the blueberry and the raspberry, which has higher levels than the blueberries. At the end of production, the Paloma variety of blueberries stood out with about 11% starch (in MS), with the Kweli variety accounting for about 12% (MS).

Keywords: blueberries, raspberries, roots, carbohydrates, physiologic cycle

Índice

Resumo.....	2
Abstract	3
Índice de Figuras.....	6
Índice de Quadros	8
Lista de Abreviaturas.....	9
1. Introdução.....	10
2. Revisão bibliográfica.....	11
2.1. Caracterização geral das plantas do mirtilo e framboesa.....	11
2.2. Framboesa e mirtilo a nível mundial e nacional.....	12
3. A planta do mirtilo.....	14
3.1. Taxonomia, origem e expansão.....	14
3.2. Morfologia.....	15
3.2.1. Sistema radicular.....	15
3.2.2. Ramos.....	16
3.2.3. Folhas	16
3.2.4. Flores.....	16
3.2.5. Frutos.....	17
3.3. Cultivares de mirtilo em estudo.....	17
3.3.1. Paloma.....	17
3.3.2. Star.....	18
3.3.3. O’Neal.....	19
3.3.4. Legacy.....	20
3.4. Condições edafo-climáticas ideais para o desenvolvimento da cultura...	21
3.5. Ciclo vegetativo e reprodutivo.....	22
4. A planta da framboesa.....	24
4.1. Taxonomia, origem e expansão da Framboesa.....	24
4.2. Morfologia.....	25
4.2.1. Sistema radicular.....	25
4.2.2. Caules.....	26
4.2.3. Folhas.....	27
4.2.4. Inflorescência.....	27
4.2.5. Frutos.....	27
4.3. Cultivares de framboesa em estudo.....	28
4.3.1. Kwanza.....	28
4.3.2. Kweli.....	28
4.4. Condições edafo-climáticas ideais para o desenvolvimento da cultura...	29
4.5. Ciclo vegetativo e reprodutivo.....	30
5. Hidratos de Carbono.....	32
5.1. Definição.....	32
5.2. Hidratos de carbono como produtos resultantes da fotossíntese.....	32
5.3. Fatores que afetam a síntese de hidratos de carbono no processo da fotossíntese.....	33
5.4. Tipos de hidratos de carbono.....	35
5.5. Fatores que afetam a transformação e translocação dos hidratos de carbono.....	37
5.6. Utilização dos hidratos de carbono pelas framboesas e mirtilos e a sua importância para o seu desenvolvimento.....	38

5.7. Translocação dos hidratos de carbono.....	41
5.7.1. Nos mirtilos.....	41
5.7.2. Nas framboesas.....	43
6. Materiais.....	46
6.1. Caracterização da região.....	46
6.1.1. Localização.....	46
6.1.2. Condições climáticas.....	46
6.2. Colheita das amostras.....	47
6.2.1. Mirtilos.....	47
6.2.2. Framboesas.....	47
6.3. Condições das plantas de mirtilo e framboesa.....	48
7. Métodos.....	48
7.1. Identificação e quantificação dos açúcares simples com base no método de HPLC.....	48
7.1.1. Procedimento.....	49
7.2. Determinação da percentagem de amido nas raízes de mirtilo e framboesa.....	50
7.2.1. Procedimento.....	51
7.3. Parâmetros adicionais.....	52
7.3.1. Estado fenológico dos mirtilos.....	53
7.3.2. Evolução da produção dos mirtilos.....	58
7.3.3. Estado fenológico das framboesas.....	59
7.3.4. Evolução da matéria seca das framboesas.....	61
7.4. Identificação dos hidratos de carbono simples nas raízes de mirtilo e framboesa.....	62
8. Estabelecimento de curvas de calibração para quantificação dos hidratos de carbono simples identificados.....	66
8.1. Doseamento de hidratos de carbono simples nas amostras de raízes de framboesa e mirtilo.....	68
8.1.1. Comentário breve às concentrações obtidas pela metodologia de HPLC para os hidratos de carbono simples nas raízes de mirtilo e framboesa e os seus limites de deteção e quantificação.....	68
9. Teores de hidratos de carbono determinados nas amostras de raízes de mirtilo e framboesa.....	69
9.1. Mirtilo.....	69
9.2. Framboesa.....	77
10. Evolução do amido e dos açúcares de baixo peso molecular nas diferentes cultivares ao longo das diferentes datas de colheitas de amostras	81
10.1. Mirtilos.....	81
10.2. Framboesa.....	85
11. Discussão geral e conclusão	88
12. Bibliografia.....	91

Índice de Figuras

Figura 1- Fruto de mirtilo e framboesa(“Banco de imagens framboesa e mirtilo,” 2017.)	11
Figura 2- Gráfico representativo dos maiores produtores de mirtilo a nível mundial no ano de 2014 (Food and Agricultura Organization of the United Nations, 2014). ...	13
Figura 3- Gráfico representativo dos maiores produtores de framboesa a nível mundial no ano de 2014 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014).	13
Figura 4- Evolução da variedade Paloma, nas diferentes datas de colheitas de amostra.	18
Figura 5- Evolução da variedade Star, nas diferentes datas de colheitas de amostra.	19
Figura 6- Evolução da variedade O’Neal, nas diferentes datas de colheitas de amostra.	20
Figura 7- Evolução da variedade Legacy, nas diferentes datas de colheitas de amostra.	21
Figura 8- Primeiro e segundo ano dos lançamentos de framboesa (Funt & Hall, 2013).	26
Figura 9- Evolução da variedade Kwanza e Kweli, nas diferentes datas de colheitas de amostra.	28
Figura 10. Representação simplificada das etapas da fotossíntese no interior do cloroplasto (Spondias, 2005).	33
Figura 11- Competição pelos fotoassimilados em diferentes etapas de crescimento do mirtilo Rabbiteye na Florida (Darnell & Birkhold, 1996).	42
Figura 12- Desenvolvimento da framboesa, juntamente com a variação sazonal dos hidratos de carbono. Adaptado de (Whitney, 1982).	44
Figura 13- Localização geográfica do concelho de Odemira (Odemira Município, 2016).	46
Figura 14- Características climáticas de Odemira no ano de 2016 (meteoblue, 2016)	47
Figura 15- Gráfico de Produção (gramas) das diferentes variedades de mirtilo ao longo do ciclo reprodutivo.	58
Figura 16. Plantas de Kweli e Kwanza na primeira data de colheitas amostrais.	59
Figura 20- Evolução do peso seco (g) da parte aérea das framboesas em estudo ao longo do seu ciclo.	61
Figura 18- Processo de obtenção da amostra moída, para posterior utilização na obtenção da percentagem de amido e identificação e quantificação em HPLC, em mirtilo e framboesa.	62
Figura 19- Cromatograma de uma solução padrão (2mg/ml) contendo 1 – frutose (tr=7,527 min), 2-glucose (tr=8,153 min), 3- sacarose (tr=10,287min), 4- rafinose (tr=17,690 min).	63
Figura 20- Cromatograma de uma amostra de mirtilo (3ªcolheita): 1 – frutose (tr=7,617 min), 2-glucose (tr=8,210 min), 3- sacarose (tr=10,487min), 4- rafinose (tr=18,117 min).	63
Figura 21- Cromatograma de uma amostra de framboesa (3ªcolheita): 1 – Frutose (tr=7,530 min), 2-glucose (tr=8,147 min), 3- sacarose (tr=10,327min), 4- rafinose (tr=17,743 min).	64
Figura 22- Cromatograma de uma amostra de mirtilo sem adição de padrão(A) comparativamente a um cromatograma da mesma amostra com adição de padrão(B) (rafinose 2mg/ml).	65
Figura 23- Reta de calibração obtida para a rafinose por HPLC.	66
Figura 24- Diferenças visuais entre as variedades O’Neal e Legacy. A- O’Neal; B- Legacy	76

Figura 25- Percentagem de amido nas variedades de mirtilo ao longo das três datas de colheita.	82
Figura 26- Evolução dos açúcares na variedade O'Neal ao longo das três datas de colheita.	83
Figura 27- Evolução dos açúcares na variedade Paloma ao longo das três datas de colheita.	83
Figura 28- Evolução dos açúcares na variedade Star ao longo das três datas de colheita.	83
Figura 29- Evolução dos açúcares na variedade Legacy ao longo das três datas de colheita.	84
Figura 30- Evolução dos açúcares nas raízes ao longo do tempo nas quatro variedades de mirtilo.	84
Figura 31- Proporção relativa de amido nas variedades de framboesa ao longo das três datas de colheita.	85
Figura 32- Evolução dos açúcares de baixo peso molecular na variedade Kwanza ao longo das quatro datas de colheita.	86
Figura 33- Evolução dos açúcares de baixo peso molecular na variedade Kweli ao longo das quatro datas de colheita.	86
Figura 34- Soma dos açúcares em estudo nas variedades Kweli e Kwanza durante as épocas de recolha de amostras.	87

Índice de Quadros

Quadro 1. Descrição e ilustração das variedades de mirtilo na 1ª data de colheita amostral.	54
Quadro 2- Descrição e ilustração das variedades de mirtilo na 2ª data de colheita amostral.	56
Quadro 3- Descrição e ilustração das variedades de mirtilo na 3ª data de colheita amostral.	57
Quadro 4. Descrição e ilustração das variedades de framboesa nas respectivas datas de colheita amostral.....	60
Quadro 5- Análise de variância ao peso seco (g) da parte aérea das framboesas em estudo ao longo do seu ciclo.	61
Quadro 6- Tempos médios de retenção obtidos na análise de amostras e soluções padrão no sistema de HPLC.....	64
Quadro 7- Parâmetros obtidos da calibração por regressão linear.....	66
Quadro 8- Quadro resumo relativo com as concentrações mg/g de Ms de raiz das variedades de mirtilo tendo em conta os LD e LQ.....	68
Quadro 9. Quadro resumo relativo com as concentrações mg/g de Ms de raiz das variedades de framboesa tendo em conta os LD e LQ.....	69
Quadro 10- Comparação dos teores de amido das diferentes variedades de mirtilo e datas de colheita (mg/ 100mg de MS).....	70
Quadro 11- Comparação entre a interação de variedades e datas de colheita em relação à concentração de Sacarose (mg/g de MS).....	72
Quadro 12- Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à concentração de Frutose (mg/g de MS).	73
Quadro 13- Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à concentração de Glucose (mg/g de MS).....	73
Quadro 14- Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à Rafinose (mg/g de MS).....	75
Quadro 15- Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação ao total de açúcares (mg/g de MS).....	76
Quadro 16- Comparação dos teores de amido das diferentes variedades de framboesa e datas de colheita (mg/ 100mg de MS).....	77
Quadro 17. Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à Sacarose (mg/g de MS).....	78
Quadro 18. Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à Frutose (mg/g de MS).....	79
Quadro 19. Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à Glucose (mg/g de MS).....	79
Quadro 20. - Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à Rafinose (mg/g de MS).....	80
Quadro 21. Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação aos açúcares totais (mg/g de MS).....	81

Lista de Abreviaturas

- ADP**- Adenosina Difosfato
ATP- Adenosina Trifosfato
CO₂- Dióxido de carbono
dS/m- deciSiemens por metro
eq- Equação
GPP- Gabinete de Planeamento e Políticas
h- hora
H₂- hidrogénio
H₂O- água
ha- hectare
HPLC- High-Performance Liquid Chromatography
INE- Instituto Nacional de Estatística
LD- limite de deteção
LQ- limite de quantificação
min- minuto
NADP- Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NHS- Northern Highbush Blueberry
PAR- Radiação Fotossinteticamente Ativa
s- segundo
SHB- Southern Highbush Blueberry
t- tonelada
tr- tempo de retenção

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a procura por parte do consumidor no que diz respeito aos pequenos frutos tem aumentado acentuadamente, sobressaindo duas culturas, a da framboesa e do mirtilo.

As suas características organoléticas e principalmente os benefícios que estas proporcionam a nível da saúde, nomeadamente fornecendo antioxidantes, vitaminas e minerais, tem levado a que os produtores tenham bastante interesse em expandir a sua área de produção, de modo a satisfazer o consumidor, algo que se tem observado nos últimos anos no território português.

A cultura do mirtilo tem sido a que mais tem crescido a nível nacional, aumentando a sua área em cerca de 3500%, isto é, em 2010 possuía uma área ocupada de 43ha e em 2016 passou a ocupar 1481ha (INE & GPP, 2017). A cultura da framboesa tem seguido a mesma linha de crescimento da cultura do mirtilo, sendo que, de 2010 a 2016 passou de 146ha de área ocupada para 911ha, correspondendo a um aumento de 625% (INE & GPP, 2017).

Portugal presentemente possui tecnologias de produção bastante desenvolvidas baseadas em conhecimentos técnico/científicos. No entanto, existe pouco conhecimento sobre a acumulação de reservas nestas duas culturas, bem como sobre a caracterização dos principais açúcares de reserva, limitação importante porque condiciona algumas decisões fitotécnicas a tomar quer no próprio ano quer no seguinte. Apesar de os mirtilos e as framboesas serem de famílias diferentes, rosáceas e ericáceas, são muito idênticos na aquisição de produtos resultantes da fotossíntese, nomeadamente os hidratos de carbono.

Os hidratos de carbono são produtos diretos da fotossíntese. Cerca de 90% da matéria seca das plantas é derivada da ação da fotossíntese, constituindo os hidratos de carbono cerca de 50 a 80% dessa matéria seca, sendo estes compostos os mais abundantes nas plantas (DaMatta, 2007)

Embora sejam as folhas o principal órgão fotossintético na transformação de energia luminosa em química, é nas raízes que os hidratos de carbono permanecem mais estáveis e onde se fixam em maior concentração, tanto a nível de hidratos de carbono simples como o principal hidrato de carbono de reserva, o amido.

Para a maioria das plantas, o uso específico dos hidratos de carbono presentes nas raízes ocorre principalmente na respiração, na expansão celular (crescimento da planta), no aumento do diâmetro do caule e da raiz, no novo crescimento da raiz, na

iniciação e desenvolvimento dos gomos, indução e formação floral, desenvolvimento dos frutos, na proteção da planta contra a seca e temperaturas extremas tanto baixas como altas. É assim de todo o interesse conhecer que hidratos de carbono e em que quantidades existem em cada fase do ciclo cultural.

O presente trabalho teve como objetivo principal a identificação e quantificação dos diferentes hidratos de carbono presentes nas raízes de mirtilo e framboesa em diferentes fases dos ciclos reprodutivo e ciclo vegetativo, no período de Março a Dezembro, para se conseguir compreender e interpretar melhor as suas oscilações nas duas culturas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Caracterização geral das plantas do mirtilo e framboesa

As framboesas são plantas perenes e agrupam-se em dois tipos de variedades, as remontantes e as não remontantes, tendo estas uma tendência de crescimento e frutificação bienal (Oliveira et al., 2007a). São plantas com alguma longevidade média, sendo que a maioria das cultivares comerciais podem alcançar uma produção de frutos durante 10 a 20 anos, dependendo das características edafoclimáticas em que estão inseridas (Funt & Hall, 2013).

Os mirtilos são arbustos lenhosos, perenes, de postura ereta, prostrados ou ambas e agrupam-se segundo o seu hábito de crescimento. Dependente da variedade e tipo de mirtilos, estes podem medir entre 0,1 m a 0,15 m de altura no tipo *lowbush*; 1,8 a 4 metros no tipo *highbush* e no tipo *rabbiteyes* podem atingir até os 6 metros (Retamales & Hancock, 2012b). Em condições edafoclimáticas e fitossanitárias ideais, a cultura do mirtilo pode ter uma grande longevidade, podendo mesmo alcançar 50 anos com boas produtividades (Handley, 2011).



Figura 1- Fruto de mirtilo e framboesa(“Banco de imagens framboesa e mirtilo”, 2017)

2.2. Framboesa e mirtilo a nível mundial e nacional

A cultura dos pequenos frutos tem aumentado bastante nos últimos anos nomeadamente o mirtilo e a framboesa, reflexo da vontade do consumidor em fazer uma alimentação com base numa dieta equilibrada, sendo estes frutos uma boa fonte de vitaminas nomeadamente C, B₁, B₂, B₆,, inúmeros minerais, compostos fenólicos, incluindo antocianinas, flavonoides, compostos que fornecem benefícios para a saúde como antioxidantes (Sousa et al., 2007).

A nível nacional, o setor dos pequenos frutos está distribuído de Norte a Sul do País. As maiores áreas de plantações de mirtilo encontram-se nas zonas de Trás-os-Montes, Sever do Vouga, Fundão, sudoeste alentejano e Algarve. A framboesa por sua vez está distribuída pelas regiões Trás-os-Montes, Fundão, sudoeste alentejano e Algarve (Consulai, 2014).

A nível nacional, no período de 2010 a 2016 o mirtilo tem vindo a aumentar a sua área em cerca de 3500%, isto é, em 2010 possuía uma área ocupada de 43ha e em 2016 passou a ocupar 1 481ha. A produção subiu de 530t para 6 572t, a que corresponde um aumento de 1240%, uma produtividade aparente um pouco abaixo da futura realidade, uma vez que as plantações são recentes e a entrada em produção demora cerca de 4 anos (INE & GPP, 2017).

A cultura Framboesa no período de 2010 a 2016 passou de 146ha de área ocupada para 911ha, correspondendo a um aumento de 625%. A produção aumentou de 2 216t para 16 972t, a que corresponde a um aumento de 770% (INE & GPP, 2017).

A nível mundial, constata-se que os Estados Unidos no ano de 2013 produziram 63% da produção mundial de mirtilo, refletidos em cerca de 239 071t, seguindo-se o Canadá com 28%. Portugal aparece na 19ª posição, com uma produção em torno de 255 toneladas de mirtilo (**Figura 2**).

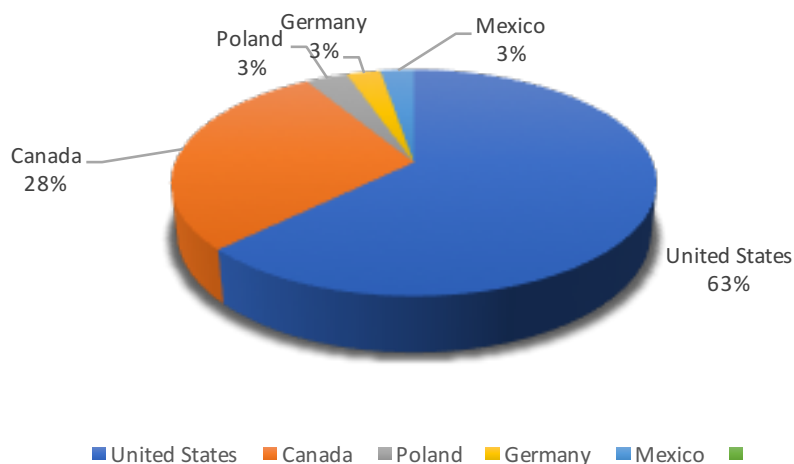


Figura 2- Gráfico representativo dos maiores produtores de mirtilo a nível mundial no ano de 2014 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014).

Em relação a produção mundial de framboesa (**Figura 3**), verificou-se que a Rússia se apresenta como o maior produtor com 31% do total, correspondente a 143 000ha num total de 578 233t, correspondentes ao ano de 2014. O segundo lugar corresponde à Polónia, com cerca de 27% correspondendo a cerca de 121 000t.

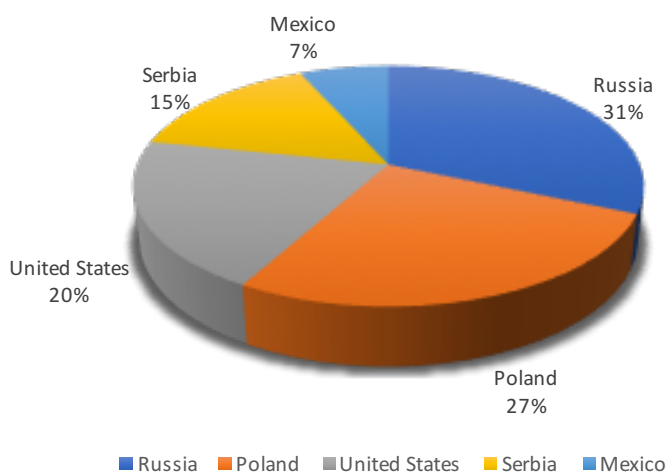


Figura 3- Gráfico representativo dos maiores produtores de framboesa a nível mundial no ano de 2014 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014).

3. A planta do mirtilo

3.1. Taxonomia, origem e expansão

Os mirtilos pertencem à família das Ericáceas e ao género *Vaccinium* e secção *Cyanococcus* (Childers & Lyrene, 2006), que inclui cerca de 150 a 450 espécies (Retamales & Hancock, 2012b). Presentemente ainda não existe um consenso sobre a origem da espécie visto que está dispersa por todo o mundo. Segundo (Trehane, 2009), cerca de 67% das variedades de mirtilo são nativas da Ásia e do Pacífico, 26% na América do Norte, 10% da América do Centro e Sul, 6% na Europa e o restante 1% encontra-se em África.

O género *Vaccinium* pode dividir-se essencialmente em dois subgéneros, designadamente, *Oxycoccus* (vulgarmente designado por *cranberries*) e *Vaccinium* (incluindo todas as outras espécies de mirtilos) (Fonseca & Oliveira, 2007). Estes subgéneros por sua vez podem dividir-se em várias secções, sendo as principais, *Oxycoccus* do subgénero *Oxycoccus* e *Vitis-Idae* e *Cyanococcus* do subgénero *Vaccinium* (Retamales & Hancock, 2012b).

A identificação de espécies da secção *Cyanococcus*, constituída por 15 espécies, que engloba os mirtilos cultivados, tem sido dificultada pela poliploidia, morfologias semelhantes, hibridação extensa e uma falta de diferenciação cromossomal (Retamales & Hancock, 2012b).

A domesticação comercial desta cultura partiu dos trabalhos de investigação conduzidos por Elizabeth White e Coville, em 1921 (Meyer & Prinsloo, 2003).

Atualmente, a literatura descreve que a maioria das cultivares comercializadas deriva da secção *Cyanococcus* destacando as espécies *Vaccinium virgatum sin.ashei* (tipo rabbiteye, hexaploides), *V. angustifolium* (tipo lowbush) e *V. corymbosum* L. do tipo *highbush*, que por sua vez se divide em *Southern highbush blueberry* (SHB) e *Northern highbush blueberry* (NHB) (Retamales & Hancock, 2012b). Porém (Madeira, 2016) refere que as plantas comercialmente disponíveis derivam duma variedade mais ampla de espécies, acrescentando o tipo *half highbush*, resultante de vários cruzamentos entre *highbush* x *lowbush*.

Na europa mediterrânica o género *Vaccinium* é mais escasso nativamente. Em Portugal continental podemos encontrar *Vaccinium myrtillus* e *Vaccinium Vitis-Idae* ambos restritos à Serra do Gerês e arredores, enquanto que nos arquipélagos podemos

encontrar *V. padifolium* endêmico na ilha da Madeira e *V. cylindraceum* endêmico dos Açores, sendo este último não comestível (Fonseca & Oliveira, 2007).

3.2. Morfologia

A morfologia da planta do mirtilo depende muito da sua espécie, tendo características específicas. Os sistemas apresentados e descritos abaixo são focados nas espécies comerciais, nomeadamente os *rabbiteye* (hexaploides), *lowbush* e *highbush* que subdividem em *Southern highbush blueberry* (SHB) e *Northern highbush blueberry* (NHS).

3.2.1. Sistema radicular

O sistema radicular dos mirtilos é bastante superficial e compacto, sendo constituído por dois tipos distintos de raízes (Fonseca & Oliveira, 2007), raízes finas, com menos de 1 mm de diâmetro, a que geralmente se dá o nome de “cabelame” e que tem como principal função a absorção de água e nutrientes; raízes mais grossas, superiores a 1 mm e podendo chegar até 1 cm de diâmetro tem, a função de suporte, fixação do solo e até mesmo de reserva de hidratos de carbono, para uma posterior utilização por parte da planta (Madeira, 2016).

As raízes dos *highbush* e dos *rabbiteye* são muito finas e desprovidas de pêlos radiculares (Darnell, 2006); essa característica das raízes tem alguma influência negativa na capacidade de absorção de nutrientes por parte da planta, no entanto essa característica pode ser contornada com o estabelecimento de simbioses com micorrizas, fungos presentes no solo que formam hifas que se expandem, em parte, nas primeiras camadas de células das raízes e no solo que as rodeia, essas hifas auxiliam a planta na absorção de nutrientes, assumindo o papel de pelos radiculares dos mirtilos (Fonseca & Oliveira, 2007; Madeira, 2016)

Segundo Retalames e Hancock (2012a), 50% das raízes está situada nos primeiros 30 cm, correspondendo esse número a 80% da matéria seca das mesmas.

O sistema radicular dos mirtilos cresce sempre que as condições ambientais no solo sejam favoráveis. O crescimento inicia-se quando o solo atinge temperaturas superiores a 6 °C e aumenta até estas atingirem os 16 °C. Dos 16 °C até aos 22°C, o crescimento abranda e cessa. Quando em condições de temperatura, humidade e arejamento do solo adequadas, uma raiz de mirtilo pode desenvolver-se até 1 mm por dia (Fonseca & Oliveira, 2007).

3.2.2. Ramos

Dependente da variedade e tipo de mirtilos estes podem atingir alturas entre 0,1m a 6 metros (Retamales & Hancock, 2012a).

O mirtilo é um arbusto constituído por inúmeros lançamentos, ramos, que têm origem em gomos recentemente formados ou de gomos dormentes situados na coroa (Fonseca & Oliveira, 2007). Os ramos surgem da base da planta, sendo herbáceos no primeiro ano, tornando-se lenhosos no segundo ano. No mirtilo o sistema radicular e a parte aérea não funcionam em total comunicação, de modo que se a água ou os nutrientes forem aplicados apenas de um lado os ramos desse lado irão ter melhor desenvolvimento. Embora estejam ligadas à mesma coroa, os ramos devem ser encarados com uma certa autonomia (Gough, 1994).

3.2.3. Folhas

A morfologia e o tamanho das folhas varia entre as espécies, podendo estas ser utilizadas como auxílio na sua identificação (Camp, 1945). As folhas do mirtilo são simples, mais o menos serrilhadas, em alguns casos glabras (*lowbush*), enquanto que noutros casos pode existir pubescência, sobretudo na página inferior (*Northern highbush*) (Retamales & Hancock, 2012b).

Os mirtilos são muito tolerantes ao frio invernal, contudo também muito exigentes em frio, o que significa que, quando as temperaturas não são suficientemente frias, não se desencadeia as reações químicas necessárias para que as folhas caiam (Madeira, 2016). Os mirtilos do tipo *highbush* e *rabbiteye* na sua região de origem são considerados plantas caducifólias, porém se as plantas forem colocadas em regiões como por exemplo no centro e sul de Portugal não perdem as folhas, ou a totalidade delas (Madeira, 2016).

Na maioria das cultivares que se encontram em stress hídrico a tonalidade da folha tende a avermelhar (Madeira, 2016).

3.2.4. Flores

As flores de mirtilo reúnem-se em inflorescências compostas por 6 a 14 flores perfeitas e completas, podem ter várias cores entre as quais creme, branco, rosados e violáceos, são hermafroditas, apresentando entre 8 a 10 estames e o ovário é ínfero com 4 a 5 lóculos e diversos óvulos por lóculo (Santos, 2015).

Os gomos distais são os que contêm maior número de flores e este diminui à medida que aumenta a distância à extremidade do ramo (Santos, 2015).

As flores são compostas por pétalas soldadas entre si, dando origem a uma pequena taça designada por corola gomilosa, de modo que a corola é bastante larga na base e muito estreita junto à boca (Madeira, 2016).

Este tipo de corola não facilita a autopolinização (Darnell, 2006). A produção e o calibre da fruta aumenta expressivamente quando existe polinização cruzada. No caso do mirtilo a polinização cruzada é mediada pelas abelhas, porém o género *Bombus* é o mais eficiente devido a trabalharem mais horas, em diferentes gamas de temperaturas. Promovendo maior vibração das flores. A característica mais favorável é possuírem uma probóscide (língua) mais longa o que facilita o seu interesse por variedades de corola mais apertada e funda (Madeira, 2016).

3.2.5. Frutos

O fruto é uma baga, tem 0,5 a 3 cm de diâmetro, com peso que pode ir até 4 gramas (Madeira, 2016). O ovário possui 100 ou mais óvulos, que se transformam em sementes depois da polinização (Darnell, 2006) e amadurece após dois a três meses, dependendo da cultivar e das condições ambientais (Retamales & Hancock, 2012b). Segundo Madeira (2016), o fruto que possui um maior número de sementes tem tendência a ser um fruto maior devido ao aumento da produção hormonal; frequentemente, verifica-se que num cacho de mirtilos pode existir frutos verdes e outros maduros. Tal facto é causado não só por uma floração mais tardia ou por uma má polinização, mas também devido a frutos com menos sementes demorarem mais tempo amadurecer. Assim, uma excelente polinização irá proporcionar uma maturação mais precoce.

3.3. Cultivares de mirtilo em estudo

3.3.1. Paloma

É uma cultivar que na Europa deve ser designada por "*Haven*" (Figura 4).

É um SHB selecionado por Patrick J. Hartmann e Arthur Elliot de Earleton, Florida, proveniente de um cruzamento natural de Avon Blue (Pinto, 2015). Nas suas características morfológicas principais, destaca-se o porte moderadamente ereto, tornando-se retumbante em plena produção. Os frutos amadurecem 40 dias após a

floração (Parente, 2014). A colheita pode ser feita manualmente ou mecanicamente, devido a maturação desta ser quase uniforme. A Paloma tem a características de ser auto fértil, não necessitando de polinizadora como outras cultivares de SHB. Em Earleton, Florida, o seu rendimento pode atingir 3,6 a 6,4 kg por planta. Os frutos são de excelente qualidade organolética (Hartmann's Plant Company, 2004).

São necessárias 100 a 600 horas de frio para que a planta quebre a dormência (Parente, 2014).



Figura 4- Evolução da variedade Paloma, nas diferentes datas de colheitas de amostra.

3.3.2. Star

Star (**Figura 5**) é um SHB selecionado através de um cruzamento entre O'Neal x Flórida 80-31, em Gainesville, Flórida (Lyrene & Sherman, 2000). As suas características morfológicas principais são porte moderadamente ereto, tem uma floração mais tardia do que os restantes SHB presentes na Florida, amadurece cedo e a colheita é feita em três semanas (Lyrene & Williamson, 2006). Requer polinização cruzada de outras cultivares do tipo SHB nomeadamente, O'Neal, Santa Fé e Emerald, para uma melhor produção. Produz frutos grandes e de alta qualidade, sendo a sua forma e peso semelhantes á O'Neal.

São necessárias 400h de frio para que a planta quebre a dormência (Lyrene & Sherman, 2000).



Figura 5- Evolução da variedade Star, nas diferentes datas de colheitas de amostra.

3.3.3. O'Neal

O'Neal (**Figura 6**) é um SHB selecionado através de um cruzamento entre 'Wolcott' × Fla. 64-15, em 1987 (Ballington, 1990). É um arbusto de vigor médio, com porte semi-ereto. A floração surge muito cedo e pode coincidir com as geadas, o que leva a uma perda significativa de flores, no entanto possui um número suficiente para produzir um rendimento razoável de frutos; o amadurecimento dos frutos é muito precoce (Ballington, 1990), sendo que a colheita ocorre, sensivelmente, 48 dias após a floração (Parente, 2014), podendo durar aproximadamente 4 semanas. Os frutos são grandes, firmes e têm um bom sabor (Pépinieres Multibaies, 2017.).

São necessárias 400 a 500h de frio para que a planta quebre a dormência (Ballington, 1990).

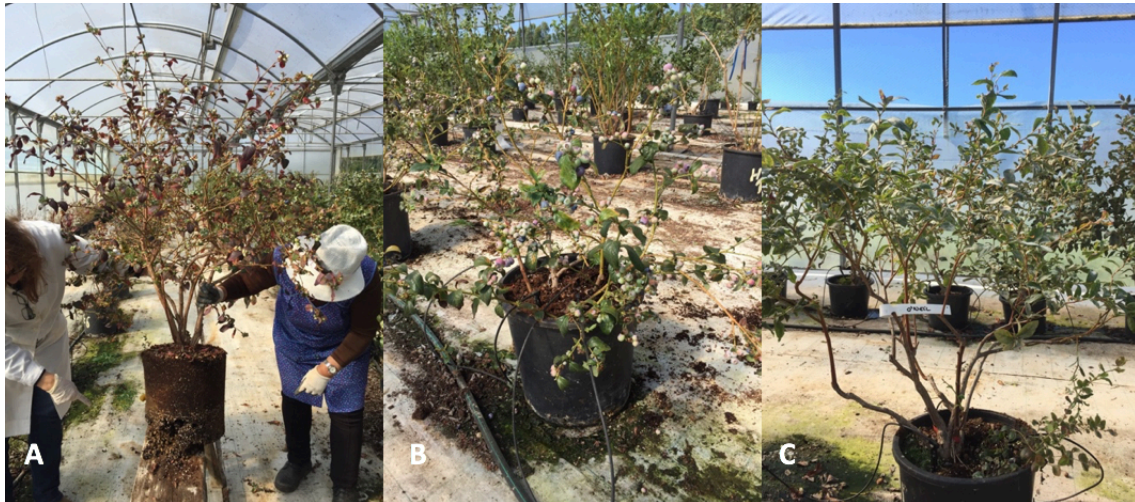


Figura 6- Evolução da variedade O'Neal, nas diferentes datas de colheitas de amostra.

3.3.4. Legacy

Legacy (**Figura 7**) uma cultivar selecionada através de um cruzamento entre 'Elizabeth' x US75, em 1988 pelas USDA e Rutgers University, Nova Jersey ("The NC Blueberry Journal: Blueberry cultivar 'LEGACY,'" 2011). O arbusto é vigoroso e ereto, com floração tardia (Childers & Lyrene, 2006). O amadurecimento dos frutos é tardio e a colheita inicia-se 60 dias após a floração (Parente, 2014).

Os frutos são de tamanho médio a grande, possuindo boas características organolépticas (Krewer & Nesmith, 2006).

São necessárias 400 a 700h de frio para que a planta quebre a dormência, sendo considerada por muitos autores uma variedade de caracter intermédio ou até mesmo uma NHB (Retamales & Hancock, 2012b).



Figura 7- Evolução da variedade Legacy, nas diferentes datas de colheitas de amostra.

3.4. Condições edafo-climáticas ideais para o desenvolvimento da cultura

Atualmente existem imensas cultivares de mirtilo geneticamente diferentes, o que leva a que as suas exigências climáticas sejam significativamente diferentes (Fonseca & Oliveira, 2007).

Em Portugal, as cultivares com mais interesse comercial são as do tipo *Northern highbush blueberry* (NHB), *Southern highbush blueberry* (SHB) e aparecendo por vezes os *Rabbiteye*; as primeiras necessitam de 500 a 1200 horas de frio (temperaturas inferiores a 7°C), os segundos com necessidades desde as 150 até às 500 horas de frio e os terceiros, menos representativos a nível nacional, necessitam de 400 as 600 horas de frio, para a quebra da dormência.

Estas necessidades distribuem os tipos de mirtilos pelo país, sendo mais adequados aos NHB para a região Centro-Norte do País e os SHB para a região Centro-Sul (Fonseca & Oliveira, 2014).

As cultivares de NHB estão adaptadas a temperaturas que podem ir abaixo de -20°C, porém as cultivares do tipo SHB não toleram temperaturas abaixo do ponto de congelação (Retamales & Hancock, 2012a).

A temperatura ideal do ar para o desenvolvimento da cultura está compreendida entre os 8 e os 20°C, visto que temperaturas inferiores a 8°C fazem cessar o crescimento e a temperaturas acima dos 20°C o crescimento vai diminuindo.

A temperatura ideal do solo para que haja uma boa absorção de água e nutrientes por parte das raízes é de 7 a 20°C (Fonseca & Oliveira, 2014). A cultura prefere um solo profundo, arejado e ácido (Demchak, 2013) rico em matéria orgânica, superior a 5%, pois mantém os nutrientes mais adsorvidos no solo, facilitando a sua absorção e evitando que sejam lixiviados (Ireland & Wilk, 2006). Para as cultivares do tipo *Highbush* o pH do solo deve situar-se entre 4,5-5,2 (Prodorutti et al., 2007).

Em relação às necessidades de rega, sendo as raízes de mirtilo muito peculiares (falta de pêlos radiculares), não toleram solos extremamente secos ou húmidos, pois podem comprometer o seu desenvolvimento (Matos, 2015), podendo as condições de má drenagem ou compactação favorecer o stress hídrico e, conseqüentemente, a proliferação de doenças radiculares (Bryla, 2011). No período de maior consumo, ou seja, do vingamento à colheita, em média cada planta consome 4 a 5 litros de água (Fonseca & Oliveira, 2014).

3.5. Ciclo vegetativo e reprodutivo

O mirtilo apresenta um ciclo de desenvolvimento anual, que pode ser dividido num crescimento vegetativo e reprodutivo, durante estes crescimentos existe competição pelos assimilados, por parte dos frutos e dos órgãos com crescimento vegetativo, nomeadamente entre o fruto e o sistema radicular. O fruto inibe hormonalmente a expansão das raízes, levando a planta a concentrar todas as suas reservas nutricionais e açucaradas na formação dos frutos (Strik & Buller, 2005).

O crescimento vegetativo começa, depois da quebra da dormência, com o inchamento dos gomos foliares (mais pequenos, aguçados e situando-se abaixo dos gomos florais na parte inferior do lançamento), o abrolhamento destes tende a ser mais lento do que o abrolhamento dos gomos florais (mais volumosos e situando-se nas extremidades dos lançamentos do ano anterior) (Madeira, 2016; Retamales & Hancock, 2012a).

O crescimento vegetativo prossegue com o desenvolvimento dos lançamentos sendo este rápido e simpodial (Shutak, 1980). Os lançamentos podem inicialmente ser interrompidos devido ao aborto apical, este fenómeno acontece nos mirtilos e é

designado de “Ponta negra” (Fonseca & Oliveira, 2007). Os fluxos de crescimento dos ramos dependem essencialmente da cultivar e das condições edafoclimáticas, podendo por exemplo os NHB ter entre dois a três fluxos de crescimento (Shutak, 1980) situados entre Junho/Julho e Agosto/Setembro (Abbott & Gough, 1987). Os lançamentos que derivam de gomos presentes na coroa têm um crescimento unicamente vertical, sem que haja formação de ramificações, só no segundo ano começa a existir abrolhamento dos gomos nesse lançamento (Retamales & Hancock, 2012a).

O crescimento dos ramos não é competitivo com o crescimento do sistema radicular, porém os frutos vão influenciar o desenvolvimento radicular (Abbott & Gough, 1987).

Segundo Fonseca e Oliveira (2007), o sistema radicular não apresenta um autêntico período de repouso, pois este desenvolve-se sempre que as condições edafoclimáticas sejam favoráveis ao seu desenvolvimento. No entanto, podem existir dois fluxos de crescimento acentuado: um na primavera, relativamente curto, durante a floração e até o vingamento do fruto; o outro fluxo ocorre após a colheita, que se prolonga até ao final do Verão, sendo este fluxo o mais evidente, visto que não existe competição entre raízes e frutos (Abbott & Gough, 1987). É nesta fase que a planta absorve o máximo de nutrientes e fotoassimilados, aumentando as suas reservas para o próximo ano (Madeira, 2016; Strik & Buller, 2005).

É um facto que o desenvolvimento da planta de mirtilo se faz em torno da formação e desenvolvimento do fruto. Segundo Fonseca e Oliveira (2007), o início do processo reprodutivo do mirtilo começa com o início da diferenciação floral no mês de Agosto, quando os dias começam a ficar mais curtos e as temperaturas noturnas mais baixas, podendo esta diferenciação floral prolongar-se até ao mês de Outubro, dependente das cultivares. Os dias de menor duração, característicos do Inverno, induzem uma maior assimilação de CO₂ pelos mirtilos (Darnell, 1991).

Desta forma há um aumento de reservas de hidratos de carbono nas plantas de fruto (Tromp, 1983) e macieiras (Hansen & Grauslund, 1973), os quais vão ser utilizados no posterior desenvolvimento das mesmas. Após este processo de diferenciação floral a planta entra em repouso vegetativo, ou seja, entra em dormência. A dormência consiste na inexistência de qualquer crescimento e numa reduzida atividade metabólica da parte aérea das plantas, sendo considerado um mecanismo de defesa que permite às plantas sobreviverem a temperaturas muito baixas (Lyrene & Williamson, 2006). Para que a planta possa iniciar o seu crescimento após esta fase, nomeadamente o abrolhamento, há necessidade de estar sujeita a um certo número de horas abaixo de 7°C (Fonseca &

Oliveira, 2007). O abrolhamento do mirtilo, em condições climáticas favoráveis, ocorre no final de inverno, início de primavera, sendo nesta altura que as necessidades de horas de frio são supridas pela maioria das cultivares (Darnell, 2006).

Com a abertura das primeiras flores, tem início a floração, dura cerca de 3 a 4 semanas (Retamales & Hancock, 2012a), usando exclusivamente reservas de hidratos de carbono do ano anterior (Madeira, 2016). A floração ocorre das extremidades do lançamento em sentido à base, os estigmas da flor do mirtilo estão recetivos entre 5 a 8 dias após a abertura das flores (Retamales & Hancock, 2012a), o crescimento do tubo polínico é favorecido pelo calor, havendo uma menor fertilidade quando ocorre chuva (Eck, 1988).

O vingamento do fruto ocorre entre 2 a 3 meses após a floração, dependente das cultivares (Fonseca & Oliveira, 2007), o fruto tem um crescimento duplo sigmoide dividido em 3 fases (Retamales & Hancock, 2012a). Na primeira fase cresce rapidamente (cerca de 30 dias), consistindo na divisão e aumento celular e ganho de matéria seca (Fonseca & Oliveira, 2007). A segunda fase corresponde ao desenvolvimento das sementes. Cada fruto do tipo *highbush* pode conter 110 óvulos (Parrie, 1990), grande parte destes não se desenvolve, ficando o fruto reduzido a 16 a 74 sementes (Darrow, 1958). Esta fase é caracterizada por ser lenta, podendo durar entre 30 a 40 dias (Darnell, 2006). A última fase dura entre a 30 a 60 dias, como as fases anteriores dependendo da cultivar e do meio ambiente, durante esta fase há uma rápida expansão celular e posterior maturação do fruto, conferindo-lhe as suas características organolépticas (Retamales & Hancock, 2012a).

4. A planta da framboesa

4.1. Taxonomia, origem e expansão da Framboesa

As framboesas pertencem à família das *Rosáceas* e ao género *Rubus L.*, sendo que, devido à diversidade deste género, houve a necessidade de o subdividir em subgéneros. Um dos subgéneros que teve mais impacto económico até ao século XXI é o subgénero *Idaeobatus* que inclui cerca de 200 espécies. Segundo (Tosun et al., 2009) a Turquia foi o local de origem da framboesa, no entanto a maior diversidade deste subgénero é encontrada no sudoeste da China, o que leva a que digam que é o mais provável local de origem. As framboesas estão distribuídas fundamentalmente no

hemisfério Norte, essencialmente na Ásia, Europa e América do Norte (Funt & Hall, 2013).

Entre as diferentes espécies de framboesa as mais importantes a nível frutícola, são *Rubus occidentalis* L. (framboesa preta), *Rubus neglectus* Peck (framboesas purpuras e híbridos da framboesas vermelhas norte americanas juntamente com as framboesas pretas), *Rubus idaeus* subespécie *vulgatus* Arrhen (framboesa vermelha europeia) e *Rubus idaeus* subespécie *strigosus* Michx (framboesa vermelha norte americana), destacando-se estas duas últimas espécies de framboesa vermelha como sendo o principal tipo domesticado (Oliveira et al., 2007). As principais diferenças morfológicas entre os dois tipos de framboesa vermelha são a inflorescência e o fruto (Oliveira, 1994), nomeadamente coloração vermelho escuro, forma cónica, com pouco ou nenhuma pubescência por parte da *R. i. vulgatus* e coloração vermelho claro, forma mais arredondada e numerosa pubescência *R. i. strigosus* (Raseira et al., 2004).

4.2. Morfologia

4.2.1. Sistema radicular

As framboesas possuem um sistema radicular fasciculado, com desenvolvimento nos primeiros 25 a 50 cm de solo com cerca de 70% das raízes nos primeiros 25 a 30 cm (Funt & Hall, 2013).

O diâmetro das raízes pode atingir no máximo 20 mm, porém a espessura mais comum corresponde 3 a 4 mm. A espessura junto à base dos lançamentos é superior em relação as restantes, no entanto não existe nenhuma relação entre o diâmetro e o comprimento das mesmas (Oliveira, 1994).

As raízes podem originar novos lançamentos, tendo esta origem tanto em gomos radiculares como em gomos dormentes na base dos lançamentos. Com o decorrer dos anos e com o renovar dos lançamentos por parte da raiz há a formação de uma nova zona “toiça” (Oliveira, 1994).

As cultivares que emitem mais lançamentos provenientes das raízes, vão originar uma maior translocação de carbono para a formação destes, comparativamente aos órgãos de frutificação (Popenoe, 1994).

Com a chegada do verão, a temperatura do solo aumenta, conduzindo a um maior crescimento por parte das raízes. Nesse período, há competição pelos nutrientes, entre

as raízes e os lançamentos (Domínguez, 2007). Porém, segundo (Privé et al., 1993), temperaturas inferiores a 16°C são as ideais para o desenvolvimento radicular enquanto que temperaturas superiores a 16°C podem levar à inibição do crescimento radicular, o que pode limitar a cultura da framboesa em regiões mais quentes.

No inverno, ocorre o crescimento de raízes adventícias, que aparecem em intervalos irregulares (Domínguez, 2007).

4.2.2. Caules

Os caules ou lançamentos da framboesa são revestidos essencialmente por acúleos, porém pode existir variedades glabras. Para além disso, possuem uma forma cilíndrica, podendo o número variar de planta para planta (Oliveira et al., 2007).

A maioria das variedades de framboesa possui um único gomo axilar por nó, porém esse gomo pode vir a desenvolver-se como gomo principal (Oliveira, 1994).

Os lançamentos das framboesas podem ser classificados quanto ao seu ciclo de vida, nomeadamente em lançamentos do ano (primocanes) ou lançamentos do segundo ano (floricanes) (Carew et al., 2000; Keep, 1988) (**Figura 8**). As primocanes, também designadas de anuais, completam um ciclo de crescimento, formação de inflorescência e frutificação em apenas um ano (Funt & Hall, 2013) enquanto que as floricanes desenvolvem gomos florais no final do primeiro ano e produzem frutos no segundo ano (Jennings, 1988).

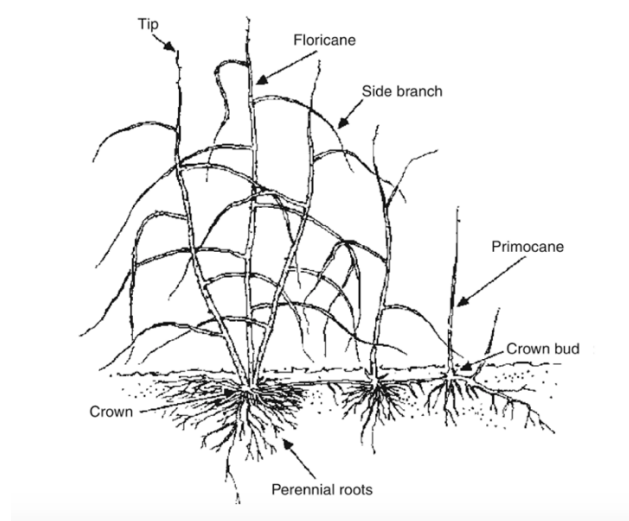


Figura 8- Primeiro e segundo ano dos lançamentos de framboesa (Funt & Hall, 2013).

A competição pelos fotoassimilados entre as primocanes e as floricanes é minimizada por outras atividades da planta quer a nível fisiológico quer a nível espacial (Waister & Wright, 1989; Whitney, 1982), citados por (Palonen, 1999a).

Segundo Neto (1997), os caules funcionam como canais dos quais os açúcares solúveis são translocados, em maior ou menor concentração, de acordo com equilíbrio entre as necessidades e síntese dos compostos carbonados.

4.2.3. Folhas

As folhas podem apresentar várias formas, dependente das cultivares e do seu estado de desenvolvimento, sendo que geralmente as folhas jovens e as dos ramos de fruto possuem três folíolos e as folhas adultas cinco (Oliveira et al., 2007).

A página inferior apresenta um grande número de estomas, porém, a página superior não possui estomas e é glabra (Oliveira, 1994).

As folhas das floricanes iniciam a transferência dos hidratos de carbono após o desenvolvimento dos lançamentos laterais continuando até a senescência das folhas (Brierley & Landon, 1936). Estes fotoassimilados são a principal fonte de hidratos de carbono usada para o desenvolvimento dos frutos (Fernandez & Pritts, 1993).

4.2.4. Inflorescência

A inflorescência das framboesas vermelhas é cimeira, isto é, a flor terminal desenvolve-se primeiramente, enquanto que as restantes flores se desenvolvem sequencialmente em direção à base (Sønsteby & Heide, 2008, 2009).

As flores das framboesas são hermafroditas e apresentam uma estrutura característica das rosáceas, possuindo cinco sépalas verdes e cinco pétalas brancas (Funt & Hall, 2013).

Quanto à polinização é maioritariamente do tipo entomófila, uma vez que as flores são grandes produtores de néctar (Domínguez, 2007).

4.2.5. Frutos

O fruto consiste num conjunto de drupas, que por sua vez corresponde a drupéolas, organizadas em torno do receptáculo. Apresenta em geral forma cónica arredondada, sendo cada drupéola constituída por uma semente dura envolvida por polpa (Oliveira et al., 2007).

4.3. Cultivares de framboesa em estudo

4.3.1. Kwanza

A Kwanza é uma variedade de framboesa bastante recente, surgindo no mercado em 2013, desenvolvida pela empresa holandesa Advanced berry breeding. Possui folhas largas, acúleos pequenos de cor vermelha, o seu crescimento é ereto e é bastante resistente a doenças. A sua colheita fica facilitada devido a um número reduzido de rebentos basais. O período de colheita da Kwanza, quando comparado com a Polka, inicia-se 10 a 20 dias mais tarde. As principais características desta variedade, e que a tornam tão atrativa para o mercado, são o tamanho do fruto, a sua forma cônica arredondada, cor vermelho alaranjado brilhante, assim como um excelente paladar devido a um elevado teor de açúcares. Possui um excelente tempo de prateleira o peso médio do fruto é 6 a 8 gramas (“Kwanza® - Abbreeding,” 2013).

4.3.2. Kweli

Da mesma forma que a variedade Kwanza, a Kweli apresenta-se como uma variedade recente, também desenvolvida pela empresa Advanced berry breeding. Possui lançamentos laterais longos que devem ser reduzidos para tornar o fruto mais visível e acessível para colheita. É bastante resistente a doenças. O que a diferencia visualmente da Kwanza são os seus acúleos verdes e pequenos. O período de colheita da Kweli pode coincidir com o da Polka ou ser ligeiramente mais tardio, isto é, em comparação com a Kwanza, a Kweli é colhida primeiro.

As principais características do fruto são a sua forma arredondada, cor vermelho médio, tem um bom tempo de prateleira compreendido entre 10 dias ou mais, porém escurece ligeiramente depois de colhida. O peso médio do fruto é de 5 gramas ou mais (“Kweli® - Abbreeding,” 2013).



Figura 9- Evolução da variedade Kwanza e Kweli, nas diferentes datas de colheitas de amostra.

4.4. Condições edafo-climáticas ideais para o desenvolvimento da cultura

Um dos fatores mais importantes para um bom desenvolvimento da cultura da framboesa é a qualidade do solo (Heidenreich et al., 2012), os solos adequados para a cultura são profundos, bem drenados com uma textura arenosa a argilosa, com um pH entre 6,2 e 6,8 (Barney et al., 2007). Segundo (Buskiené & Uselis, 2008) o intervalo de pH ótimo de produção de framboesa está compreendido entre 5,5 e 6,5. Os solos alcalinos (pH acima de 7,0) podem criar problemas de micronutrientes, particularmente clorose de ferro (Barney et al., 2007).

Locais com salinidade, ainda mesmo que seja moderada, devem ser evitados, dado que as plantas que possuem frutos nos lançamentos, tal como é o caso da framboesa, são muito suscetíveis a lesões causadas por excesso de sais do solo (Baker & Butterfield, 1951). Segundo Rubio, (2014) o valor de 1,2 dS/m pode conduzir a um decréscimo na produção.

A quantidade de água disponível para a planta de framboesa durante a estação de crescimento e frutificação é muito importante. Excesso de água pode resultar em problemas como doenças radiculares, enquanto uma escassez de água pode reduzir o vigor geral da planta, prejudicando especialmente o seu rendimento e qualidade (Ramos & Franco, 2014).

Segundo (Sousa et al., 2014) para a variedade Kweli, 22 dias de armazenamento a 0/4°C, perfazendo um total de 528h é aparentemente suficiente para satisfazer as suas necessidades de frio.

Dependendo da variedade, temperaturas demasiado baixas (-10 a -20 °C) podem resultar em danos nas raízes e ausência de abrolhamento ou então resultar apenas no abrolhamento de alguns gomos, mas abaixo do ótimo (Sønsteby & Heide, 2014). A ocorrência de danos nos lançamentos verifica-se especialmente para temperaturas abaixo de -20 °C (Hall & Sobey, 2013).

A taxa de crescimento nas cultivares de frutificação florricane e primocane aumenta com a temperatura (Carew et al., 2000; Kershaw, 1991), o aumento das temperaturas também proporciona uma floração e frutificação mais precoce nas primocanes (Kershaw, 1991).

As temperaturas ótimas de funcionamento das folha estão perto de 18 ° C a 21 ° C enquanto que as das raízes estão entre 24 ° C a 26 ° C (Williams, 1959).

4.5. Ciclo vegetativo e reprodutivo

A framboesa apresenta um ciclo de desenvolvimento distinto em dois grupos de cultivares, com diferentes ciclos de vida. Nas cultivares de frutificação bienal (não remontantes) mais comuns, os rebentos têm um ciclo de vida de 2 anos durante o qual passam por uma fase sazonal envolvendo crescimento vegetativo, formação de flores e frutificação, bem como indução de gomos e quebra de dormência (Hudson, 1959; Sønsteby & Heide, 2008; Williams, 1959). Por outro lado, nas cultivares de frutificação anual (remontantes), todo o ciclo de crescimento vegetativo, floração e frutificação é normalmente concluído numa única estação de crescimento (Carew et al., 2000; Keep, 1988). Durante estes crescimentos existe competição pelos assimilados, nomeadamente entre a fase de crescimento dos lançamentos vegetativos e a fase de crescimento dos lançamentos frutíferos (Oliveira et al., 2007).

As cultivares de framboesas, começam o seu ciclo vegetativo com a formação de lançamentos novos a partir dos gomos da raiz e dos gomos axilares da base dos lançamentos (Hudson, 1959), à medida que a temperatura aumenta na primavera. Porém, os lançamentos podem emergir no Outono, tendo neste caso de passar por um período de dormência no inverno, retomando o crescimento apenas na Primavera. (Oliveira, 1994; Williams, 1959).

Durante a Primavera e o Verão, os lançamentos passam por uma fase de crescimento vegetativo contínuo com um carácter sigmoide, isto é, possui uma taxa de crescimento lenta no início, que aumenta durante o verão e volta a diminuir no final (Carew et al., 2000). Segundo (Heide & Sonsteby, 2011), isto significa que temperaturas altas e fotoperíodos longos são essenciais para o crescimento contínuo dos lançamentos. A partir deste ponto, os ciclos das cultivares anuais e bienais diferem. Embora o crescimento de cultivares de frutificação anual seja interrompido relativamente cedo no Verão pela formação de flores terminais que se desenvolvem diretamente e estabelecem frutos (Keep, 1988; Sønsteby & Heide, 2009; Williams, 1959) as cultivares bienais, continuam a crescer até ao Outono, quando o crescimento diminui e chega a uma fase de dormência (Esteves et al., 2011) devido a diminuição dos dias e as temperaturas baixas (Funt & Hall, 2013).

Antes da framboesa bienal entrar em plena dormência passa pela fase de indução floral, processo no qual o meristema apical passa de estado vegetativo para reprodutivo, os gomos ficam aptos para diferenciar flores; a próxima fase corresponde à diferenciação floral, sendo uma alteração fisiológica que conduz à formação de primórdios florais que posteriormente originaram botões florais (Fonseca, et al., 2007; Sønsteby & Heide, 2008). Nas variedades remontantes a indução floral ocorre no verão, quando o lançamento ainda está a alongar não chegando a entrar na dormência (Funt & Hall, 2013). O processo progride basipetalmente e, no final da estação, todos os gomos laterais, exceto os a nível do solo, são florais ficando os mesmos latentes e a planta entra em dormência (Williams, 1959). O período de endodormência é relativamente curto, no entanto, a duração da dormência pode ser influenciada pelas condições durante a estação de crescimento, idade da planta e diferenças genéticas entre as cultivares (Palonen & Lindén, 2006). Segundo (White et al., 1998), a dormência é quebrada primeiramente na parte superior dos lançamentos (dominância apical) devido à substituição do estado endodormente (controlado pelo próprio gomo) para o estado paradormente nas partes inferiores dos lançamentos, que perdura até serem atingidas as determinadas horas de frio.

Depois das exigências de frio serem satisfeitas, na maioria das variedades a exigência é entre 800 a 1600 horas (Funt & Hall, 2013), podendo existir variedades remontantes com menores necessidade de frio (Rubio et al., 2014), o gomo terminal desenvolve uma inflorescência. Cada inflorescência pode possuir entre 3 a 75 flores (Oliveira et al., 2007). A baixo do ápice, existem alguns gomos, por vezes esses gomos são designados como imaturos, pois não são bem desenvolvidos e acabam por morrer no inverno (Hudson, 1959).

A floração pode ocorrer entre 1 a 3 semanas. Na abertura da flor, as anteras têm os filamentos curvados sobre os estiletos e estigmas, estando todos estes imaturos. Em seguida, os estames exteriores curvam para o exterior em direção às pétalas e as anteras iniciam a deiscência; à medida que esta progride para o interior da flor, o receptáculo expande, os estiletos alongam e os estigmas ficam recetivos. A queda das pétalas ocorre 1 a 2 dias após a abertura da flor (Oliveira et al., 2007).

Após a fecundação, o ovário desenvolve o fruto, sendo este um agregado de drupéolas formado pela união de um grande número de ovários todos da mesma flor e unidos ao mesmo receptáculo (Oliveira et al., 2007).

Se as necessidades de frio não forem satisfeitas, o abrolhamento pode ser insuficiente, levando à formação de uma reduzida área foliar, fraco desenvolvimento de flores, mau vingamento e produção muito reduzida (Carew et al., 2000).

5. Hidratos de carbono

Embora os mirtilos e as framboesas sejam de espécies diferentes, são muito idênticos na aquisição de produtos resultantes da fotossíntese, nomeadamente os hidratos de carbono que são cerca de 50 a 80% dessa matéria das plantas (DaMatta, 2007; Tromp et al., 2005).

5.1. Definição

Os hidratos de carbono podem ser também conhecidos por um termo mais generalista; “Açúcares” ou por Glúcidos, Glicídios ou sacarídeos sendo essencialmente compostos orgânicos ternários, ou seja, constituídos por átomos de Carbono, Oxigénio e Hidrogénio (Vilén, 2013).

A formula empírica utilizada para a sua caracterização é $C_x (H_2O)_y$, seguem proporção entre átomos de 1:2:1 (Gill, 2015). No entanto, existe alguns hidratos de carbono que não seguem esta proporção como exemplo o caso da Fucose $C_6H_{12}O_5$ (Smith, 2000).

Em química, os hidratos de carbono, são definidos como Poli-hidroxi aldeídos ou Poli-hidroxicetonas, designando-se por aldoses ou cetonas caso o seu grupo funcional seja aldeído ou cetonas (Bennion, 1980).

5.2. Hidratos de carbono como produtos resultantes da fotossíntese

O processo descrito na **(Figura 10)** é o processo da fotossíntese, em que a energia luminosa é armazenada sob a forma de glucose (monossacárido), produzido a partir do CO_2 existente na atmosfera e de H_2O absorvida pela planta.

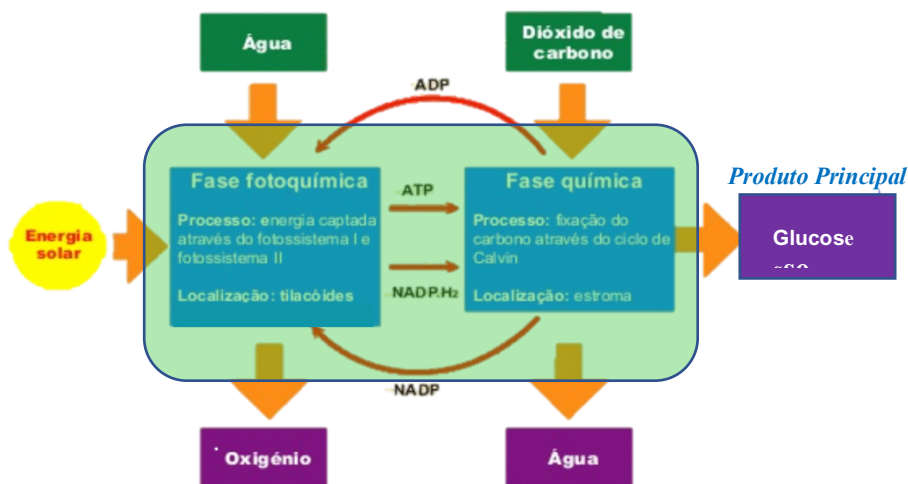


Figura 10. Representação simplificada das etapas da fotossíntese no interior do cloroplasto (Spondias, 2005).

Quando o CO₂ e H₂O se combinam para dar origem a glicose, forma-se também um subproduto da reação, o O₂ (Carrapiço, 2002) e pelos mesmos estomas que entra o CO₂ também existe perda de H₂O por transpiração, necessária para regular a temperatura da planta, (Retamales & Hancock, 2012b) todo este processo ocorre no cloroplasto (Carrapiço, 2002).

As moléculas de glicose, unidas a moléculas de frutose podem originar sacarose, formar amido, ou ainda serem convertidas em outros tipos de substâncias. Estes hidratos de carbono estão presentes em inúmeras atividades da planta nomeadamente, respiração celular, formação de celulose, síntese de proteínas, utilizados como reservas para utilização posterior, dentre outros (Sá Lima, 2017).

5.3. Fatores que afetam a síntese de hidratos de carbono no processo da fotossíntese

Durante o processo da fotossíntese existem vários fatores que podem interferir a nível de eficiência por parte da planta, designadamente a intensidade luminosa (PAR), concentração de CO₂, superfície foliar, temperatura e a disponibilidade de constituintes essenciais para a planta (água e nutrientes) (Carrapiço, 2002; Lourenço, 2014; Sá Lima, n.d.; Spondias, 2005).

Intensidade luminosas fracas levam a que o CO₂ gasto pela respiração exceda as pequenas concentrações de CO₂ fixadas pela fotossíntese, originando um balanço energético negativo por parte da planta. Um aumento da PAR (radiação fotossinteticamente ativa) acabará por permitir uma maior fixação do CO₂ e compensar a perda sofrida pela respiração.

Existe um ponto de compensação em que a fixação de carbono é igual aos seus gastos, este ponto tem o nome de ponto de compensação da luz; em que nos mirtilos *V.darrowii* e *V. carymbosum* é cerca de 50 μmol/m²/s (Moon et al., 1987) e nas framboesas 20,58-72,09 μmol/m²/s (Yunqing et al., 2015).

As taxas fotossintéticas aumentam à medida que a luz atinge intensidades mais altas, quando a folha de mirtilo (rabbiteye, highbush e darrowii) atinge um valor de PAR de cerca de 700-800 μmol/m²/s correspondendo a 40 a 50% de intensidade máxima da luz, as plantas atingem o seu ponto de saturação, o ganho de CO₂ é muito superior ao gasto pela respiração (Moon et al., 1987; Teramura et al., 1979). O ponto de saturação das framboesas é atingido quando a PAR alcança valores superiores a 600 μmol/m²/s, podendo originar a dormência precoce dos gomos, diminuição de peso e qualidade do fruto das framboesas primocanes (Remberg et al., 2010).

Atualmente a atmosfera do nosso planeta consiste numa mistura de diversos gases, dos quais se destacam o azoto com cerca de 78% e o oxigénio com cerca de 20%, a restante percentagem é constituída por gases menos comuns, onde está incluído o dióxido de carbono com uma percentagem diminuta de cerca de 0,03%, o que nos leva a concluir que este gás é um fator limitante devido à sua baixa percentagem (Carrapiço, 2002).

A quantidade de radiação que uma planta recebe não só determina a produção potencial de hidratos de carbono através da fotossíntese, mas também define a qualidade da fruta, morfologia da planta e produtividade (Jia et al., 2005).

Esta é a razão pelas quais as zonas com menor exposição solar, no interior da copa das plantas, não só geram uma menor quantidade de hidratos de carbono, mas também menores quantidades de frutos (devido a uma menor potencial, para induzir os gomos florais) (Dale & Janick, 2011).

Estudos realizados por (Braun et al., 1989) em framboesas não remontante indicaram que 55 a 60% das flores e frutos se encontravam na zona da canópia sujeita a apenas 25% ou menos da PAR, sendo esta a zona mais produtiva.

Estes estudos concluíram também que a produtividade aumentava com a radiação disponível, sendo o vingamento de 90% em zonas sujeitas a mais de 25% da PAR e de menor de 50% em áreas expostas a menos de 25% da PAR (Braun et al., 1989) citado por (Oliveira et al., 2007).

A relação entre superfície foliar total da planta e o solo que ela ocupa é designada por Índice de área foliar (IAF) (Retamales & Hancock, 2012b), portanto é necessário ter um IAF adequado para que o maior número de folhas possível estejam expostas ao sol e evitar ao máximo que existam folhas ensombradas por outras. Logo, elevados índices de área foliar possibilitam à planta regenerar mais rapidamente os teores de hidratos de carbono de reserva do sistema radicular (Whitney, 1982).

Na etapa química, todas as reações são catalisadas por enzimas, sendo a sua atividade influenciada pela temperatura.

Um aumento de 10 °C na temperatura vai proporcionar o dobro da velocidade das reações químicas, no entanto, a partir de temperaturas próximas a 40 °C, começa a ocorrer desnaturação enzimática, e a velocidade das reações tende a enfraquecer (“Fatores que influenciam a fotossíntese”, 2017).

Existe uma temperatura ótima para cada planta, na qual a atividade fotossintetizante é máxima; como foi referido nas características morfológicas, a temperatura ótima da framboesa é entre 18 °C a 21 °C e a do mirtilo entre 8 a 20°C.

Da água absorvida pela planta, é utilizada no processo fotossintético menos de 1%, a restante é utilizada noutras atividades metabólicas ou perdidas pela transpiração (Carrapiço, 2002).

Tendo em atenção os nutrientes, podemos dizer que num modo geral todos afetam o processo fotossintético, pois uma desordem nutricional pode levar à morte da planta. Mas sendo a fórmula da molécula de clorofila a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) evidenciando a composição por magnésio e azoto, tem de ser atenção a estes nutrientes (Costa, 2014).

5.4. Tipos de hidratos de carbono

Os principais hidratos de carbono existentes nas plantas podem ser classificados em três grupos, o grupo dos monossacáridos, oligossacáridos e polissacáridos (Lindhorst, 2000).

Os Monossacáridos, também conhecidos por hidratos de carbono simples, são relativamente pequenos e solúveis em água, sendo os mais comuns nas plantas, a glucose ($C_6H_{12}O_6$) e frutose ($C_6H_{12}O_6$). Ambos apresentam a mesma fórmula química, porém a glucose tem como grupo funcional o aldeído e, portanto, é designada de aldohexose e a frutose possui o grupo cetona e é designada por ceto-hexose.

Os oligossacarídeos são hidratos de carbono que resultam da união de duas a dez moléculas de monossacarídeos, sendo esta união possível por meio de ligações glicosídicas. Este grupo de hidratos de carbono pode ser dividido em dois subgrupos, os dissacarídeos, sendo o açúcar mais abundante nas plantas a sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) e os trissacarídeos, representados pela rafinose ($C_{18}H_{32}O_{16}$), sendo estes sintetizados a partir da incorporação de unidades de galactose à molécula de sacarose; quando hidrolisados pela ação de α -galactosidase, libertam galactose livre e sacarose.

O grupo dos polissacarídeos compreende os hidratos de carbono formados pela união de mais de dez monossacarídeos ligados em cadeia, originando assim um polímero de monossacáridos. Não são solúveis em água e possuem duas funções biológicas fundamentais nas plantas, nomeadamente como forma de hidrato de carbono de reserva (amido) e como hidratos de carbono estruturais (celulose).

O amido é o hidrato de carbono de reserva mais abundante nas plantas, estando presente no cloroplasto das folhas e no amiloplasto dos órgãos de reserva, resultando da polimerização de Glucose (Lourenço, 2014).

É constituído por dois polissacarídeos: α -Amilose e Amilopectina, sendo esta última uma macromolécula mais hidrossolúvel e maior do que a amilose, pois apresenta 2000 a 200 000 resíduos de glucose na sua constituição, a amilose apresenta 200 a 1000 resíduos de Glucose (Tromp et al., 2005).

O amido é sintetizado a partir da polimerização da glucose nos cloroplastos e nos amiloplastos dos órgãos de reserva (Pfister & Zeeman, 2016).

A Amilopectina é a forma mais representativa dos grãos de amido, representando valores superiores a 60-95% de amido armazenado (Tromp et al., 2005).

Apesar dos hidratos de carbono referidos anteriormente serem considerados os mais abundantes nas plantas (Palonen, 1999a), existe uma vasta gama dos mesmos (hidratos de carbono de reserva, solúveis e insolúveis), cuja natureza química e quantidades presentes, variam com o local, tempo (diariamente, estações do ano, ciclo

da planta) , de órgão para órgão, célula para célula e espécie para espécie (Lewis, 1984;Oliveira & Priestley, 1988).

Nas espécies da família *Rosáceas* o sorbitol foi reconhecido como sendo o principal hidrato de carbono transportado via floema (Ahmad et al., 2007). Numa investigação realizada por Wallaart (1980), sobre a distribuição do sorbitol nas *Rosáceas*, verificou que as folhas de macieira (*Malus silvestris*) apresentavam 2,0% e a pereira (*Pyrus communis*) 8,7%, não detetando qualquer teor de sorbitol em folhas de framboesa (*Rubus idaeus*).

5.5. Fatores que afetam a transformação e translocação dos hidratos de carbono

Durante o ciclo cultural os hidratos de carbono são sujeitos a diversas alterações na planta, quer no momento da síntese quer já nos órgãos de armazenamento. Os fatores principais que podem influenciar estas alterações podem ser internos como no caso do valor de pH, concentração dos hidratos de carbono, a nível externo o fator com maior relevo é a temperatura (Lourenço, 2014).

As oscilações de concentração de hidratos de carbono não foram associadas a mudanças no estado de dormência, mas foram induzidas por mudanças climáticas (Jennings, 1975).

As enzimas possuem um papel fundamental quer no que diz respeito a acumulação de hidratos de carbono quer na sua degradação (Tromp et al., 2005).

A sacarose, frutose e glucose estão sujeitas a três enzimas específicas nomeadamente, invertases, sacarose fosfato sintase (SPS) e a sacarose sintase (SuSy). As invertases podem possuir três caracteres sendo estes, ácido, neutro ou alcalino. As invertases catalisam a hidrólise irreversível de sacarose em glucose e frutose e estão implicadas em vários aspetos do ciclo de vida vegetal e de respostas aos estímulos ambientais (Roitsch & González, 2004).

Em contrapartida, a SPS funciona no sentido da síntese de sacarose (UDP-glucose + frutose-P → sacarose-P + UDP) enquanto que a SuSy catalisa uma reação reversível (UDP-glucose + frutose → sacarose + UDP) (Sturm & Tang, 1999) citado por (Pereira Baliza et al., 2011).

A conversão do amido em açúcares solúveis dá-se pela ação de enzimas específicas nomeadamente amílases α e β . Da ação da α -amílase resulta glucose e maltose e na β -amílase resulta maltose (Lourenço, 2014).

Estas enzimas acima referidas são sensíveis a valores de pH, sendo este fator decisivo na velocidade da reação bem como no sentido da reação; no caso das células ostiolares dos estomas, quando existe um decréscimo do valor de pH, o açúcar é convertido em amido e quando existe um aumento do valor de pH existe uma conversão de amido em açúcar (Lourenço, 2014).

Durante o dia, em que há uma elevada taxa fotossintética e, portanto, uma maior concentração de hidratos de carbono, o amido é depositado nas folhas, e é degradado na ausência de luz (escuro), originando produtos utilizados, na maioria, na síntese de sacarose e na respiração da planta (Zamski & Schaffer, 1996).

Este amido sintetizado nos cloroplastos é conhecido como amido transitório, sendo minoritário comparado com a acumulação massiva de amido em sementes e órgãos de reserva, raiz (Herold, 1984).

A temperatura é o fator externo que mais condiciona os hidratos de carbono. No período em que existe temperaturas mais baixas (Inverno), existe conversão de amido em açúcares solúveis (Sauter, 1988), através da ação das enzimas anteriormente mencionadas, devido à atividade da amílase ser induzida sob baixas temperaturas, hidrolisando o amido, aumentando a concentração de açúcares (Bonhomme et al., 2005).

Segundo Guy et al., (2008), a hidrólise do amido tanto pode ocorrer sob baixas temperaturas durante o inverno como também no início da Primavera com o aumento progressivo da temperatura e do dia coincidindo com a presença de alguns abrolhamentos nesta altura. Esta hidrólise que ocorre na ausência de baixas temperaturas, é induzida pela β -amílase e a fosforilase (Guy et al., 2008).

5.6. Utilização dos hidratos de carbono pelas framboesas e mirtilos e a sua importância para o seu desenvolvimento

Para a maioria das plantas, o uso específico dos hidratos de carbono presentes nas raízes e outras reservas radiculares é particularmente na respiração, na expansão celular (crescimento da planta), no aumento do diâmetro do caule e da raiz, no novo

crescimento da raiz, na iniciação e desenvolvimento dos gomos, indução e formação floral e no desenvolvimento dos frutos, na proteção da planta contra a seca e temperaturas extremas (Darnell, 1991; Palonen, 1999b; Raya, 2006; Retamales & Hancock, 2012a; Valenzuela-Estrada, 2008).

Segundo Lewis, (1984), não existe evidências que sugiram que as raízes contenham reservas únicas de hidratos de carbono.

A sacarose é a principal forma de transporte de assimilados, encontrando-se geralmente em concentrações elevadas. Este hidrato de carbono assume vários papéis no que diz respeito ao metabolismo da planta, nomeadamente, a principal forma de translocação de carbono (Koch, 2004). Quando hidrolisada (invertase alcalina) pode fornecer carbono para a respiração (Lourenço, 2014); um aumento do potencial osmótico (duas hexoses a partir apenas de uma molécula de sacarose proporcionado pela invertase ácida) pode originar uma rápida expansão celular (Irving et al., 1997).

A sacarose é hidrolisada em glucose e frutose, através da invertase alcalina, com o intuito de facilitar a mobilização destes hidratos de carbono, sendo estes usados na respiração e crescimento da planta (Godt & Roitsch, 1997). Darnell (1991) verificou que, nas folhas de mirtilo rabbiteye, existia glucose, sacarose e frutose, sendo que a glucose e frutose existiam numa proporção de 1:1.

Os olissacarídeos da série da rafinose são bastante frequentes. Embora presentes em pequena concentração (Palonen & Lindén, 2006) podem surgir em todas as partes da planta, podendo desempenhar a função de proteção contra a seca e baixas temperaturas, além de também atuarem como compostos de reserva (Palonen, 1999a; Taji et al., 2002).

Com o avanço do ciclo da planta, esta entra em dormência, época em que os açúcares solúveis são convertidos em amido, sendo que este último alcança a sua concentração máxima no final do outono, período de início de queda das folhas (Alves et al., 2007).

O amido é a principal reserva de hidratos de carbono no mirtilo (Darnell & Birkhold, 1996). No entanto segundo (Snyder & Richey, 1930) o amido na framboesa, relativamente à sacarose, glucose e frutose, é geralmente maior na Primavera do que no Outono, o que pode indicar que a planta provavelmente armazena as suas reservas sob a forma de hidratos de carbono mono e oligossacáridos.

Com a chegada do inverno e a aparecimento das baixas temperaturas, ocorre a degradação do amido em açúcares simples, sendo nesta época essenciais para o início do desenvolvimento de um novo ciclo das plantas (Raya, 2006; Retamales & Hancock, 2012a).

Em certas espécies de mirtilos, o abrolhamento dos gomos vegetativos dá-se em simultâneo com o abrolhamento dos gomos reprodutivos, como é o caso dos rabbiteye, tornando-os dependentes dos hidratos de carbonos armazenados (Birkhold et al., 1992). Nos SHB, o abrolhamento do gomo reprodutivo ocorre simultaneamente com o do gomo vegetativo, em alguns casos, até quatro semanas antes do abrolhamento vegetativo (Maust et al., 2000), levando que o fruto se desenvolva sustentado principalmente por reservas, uma vez que a área foliar é insuficiente e ainda não tem a plena capacidade fotossintética (Darnell & Birkhold, 1996). No caso de algumas variedades NHB, o abrolhamento gomos reprodutivos ocorre após o dos gomos vegetativos, por conseguinte as folhas recentemente formadas são capazes de fornecer alguns hidratos de carbono para o desenvolvimento da planta, tornando os hidratos de carbono de reserva não tão fulcrais (Maust et al., 1999).

Nas framboesas, os lançamentos do segundo ano ,floricanes são os primeiros a desenvolver a biomassa foliar, este desenvolvimento acontece, devido às reservas de hidratos de carbono acumuladas na raiz e nos caules no ano anterior (Oliveira et al., 2007). A utilização destas reservas é necessária, pois ainda não existe biomassa foliar suficiente para suportar o seu desenvolvimento dos mesmos. O crescimento dos lançamentos do ano, primocanes inicialmente depende das reservas do sistema radicular (Oliveira et al., 2007), mas com o decorrer do ciclo da planta, estes são capazes de utilizar parte dos fotoassimilados sintetizados pelos floricanes, devido à translocação destes para a raiz, enquanto não se dá a senescência do floema (Brierley & Landon, 1936). Uma vez desenvolvida a biomassa foliar suficiente para suportar o desenvolvimento da planta, o sistema radicular rapidamente se reabastece de hidratos de carbono (Crandall et al., 1974). O desenvolvimento do fruto depende dos hidratos de carbono das folhas fotossintéticas mais próximas (Fernandez & Pritts, 1993).

No final de uma estação de crescimento, as raízes, geralmente são o órgão da planta que contém maiores concentrações de hidratos de carbono e outras reservas do que quaisquer outros tecidos ou órgãos (Loescher et al., 1990) o que nos leva a que o seu estudo nos proporcione uma melhor compreensão da fisiologia das Framboesas e Mirtilos.

5.7. Translocação dos hidratos de carbono

Têm existido alguns estudos sobre a translocação dos hidratos e carbono nas plantas, de maneira a compreender melhor a sua fisiologia. Flore & Layne, (1999) no estudo sobre a produção de fotoassimilados e a sua distribuição nas cerejeiras, observaram que as folhas são a principal fonte de hidratos de carbono durante o verão, enquanto que os tecidos de reserva, como os lançamentos mais antigos, os gomos e as raízes, são as fontes mais importantes para o desenvolvimento das folhas e desenvolvimento dos gomos iniciais durante a primavera.

5.7.1. Nos mirtilos

Darnell & Birkhold, (1996) e Maust et al., (1999) encontraram algo semelhante antes mencionado para os SHB e rabbiteye, respetivamente, descobrindo que as concentrações de amido dos lançamentos e da raiz diminuíram rapidamente durante as primeiras quatro semanas de desenvolvimento de frutos, indicando que raízes e lançamentos (caules) são as principais fontes de hidratos de carbono durante a Primavera.

No verão, devido as folhas estarem totalmente expandidas e em plena atividade fotossintética, estas funcionam como principais exportadores de hidratos de carbono (Darnell & Birkhold, 1996; Maust et al., 1999).

Os hidratos de carbono são distribuídos/translocados de acordo com a hierarquia do órgão, a distância entre a source (fonte) e sink (recetor) e a força da sink, isto é, a capacidade de o recetor influenciar a absorção dos hidratos de carbono para o seu desenvolvimento em detrimento da escassez deles noutra sink não tão “importante” para a planta.

Frutos, lançamentos, folhas e raízes recebem hidratos de carbono em ordem decrescente, sendo a planta a principal organizadora dessa distinção. Sinks que estão mais próximas das sources ou que tenham ligação vascular direta obtêm mais hidratos de carbono. Quanto maior e mais ativo for a sink, maior a força do sink, portanto, maior translocação de hidratos de carbono para esse órgão (sink) (Flore & Layne, 1999).

De acordo com (Retamales & Hancock, 2012a), durante o ciclo cultural do mirtilo as sinks podem ser alteradas. Em plantas jovens que ainda não entraram em produção, ou mesmo plantas adultas que estejam no desenvolvimento vegetativo, a maioria dos hidratos de carbono é translocada para o crescimento vegetativo, como raízes, folhas e

lançamentos. À medida que a planta se desenvolve e entra no ciclo reprodutivo, nomeadamente, a partir do vingamento do fruto, o fruto passa a ser a principal sink, exigindo maiores quantidades de hidratos de carbono à planta em relação aos outros órgãos; no final da produção, começa a diminuir a translocação dos hidratos de carbono para os frutos e começa a ser as raízes a sink principal, seguido das folhas e lançamentos, para a planta.

A planta independente da fase do seu ciclo consegue garantir qual o órgão mais influente naquele momento, centrando o seu esforço nesse órgão e proporcionando-lhe um desenvolvimento sem escassez de hidratos de carbono. Mesmo quando a planta se encontra numa fase final de vida, de 20-30 anos, uma sink principal nunca deixa de ser uma sink principal, porém a planta já não lhe faz chegar uma quantidade de hidratos de carbono que lhe chegaria numa fase de produtividade máxima (Retamales & Hancock, 2012a).

Através da **(Figura 11)** podemos observar o que foi descrito no parágrafo anterior, o crescimento de alguns órgãos num determinado período gera uma competição entre eles, sendo que a sink mais forte prevalece, sendo o seu crescimento auxiliado pelas reservas da planta.

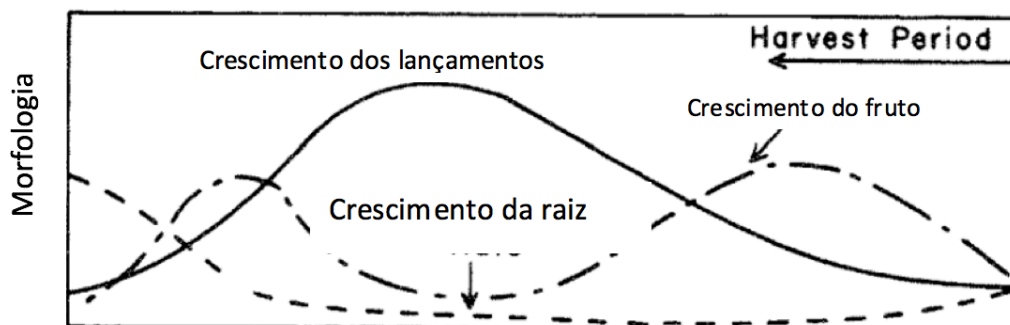


Figura 11- Competição pelos fotoassimilados em diferentes etapas de crescimento do mirtilo Rabbiteye na Florida (Darnell & Birkhold, 1996).

As concentrações de açúcares solúveis totais, nas raízes e caules dos mirtilos de rabbiteye diminuem da dormência para a plena floração, mas permanecem constantes ao longo do desenvolvimento dos frutos (Darnell & Birkhold, 1996).

A concentração de amido pode sofrer oscilações muito acentuadas. No estudo realizado por (Darnell & Birkhold, 1996), nas raízes dos mirtilos de rabbiteye Climax e Bonita, mesmo tipo de mirtilos, observou-se que nas variedades, as concentrações de amido de raiz em Bonita diminuíram entre a dormência e a floração, no entanto, a diminuição

foi mais gradual na variedade Climax. Na floração, houve uma concentração de amido 3 vezes maior nas raízes da variedade Climax do que nas raízes da variedade 'Bonita'.

Embora a concentração do amido do caule também diminua da dormência para a plena floração, a diminuição é menos drástica. A diminuição dos açúcares simples e amido das raízes e caules durante a primavera indicam um início de desenvolvimento da planta.

A concentração de amido nas raízes dos SHB diminui da dormência até 28 dias após a plena floração (d.a.f.b.). Dependendo da cultivar, a concentração de amido na raiz continuará a diminuir ou aumentará, como no caso de Misty e Sharpblue. Nas cultivares SHB Misty e Sharpblue, a concentração de amido nos lançamentos diminui até os 28 d.a.f.b. E tem um aumento pouco significativo até ao início da colheita dos frutos (Maust et al., 1999).

Quando a planta mantém folhas por um período mais longo, a translocação de hidratos de carbono é afetada. As concentrações de hidratos de carbono nos lançamentos e nas raízes são iguais, ou menores do que em plantas que já não tenham a maioria das folhas, mas a síntese é maior devido a maior capacidade fotossintética. Isso indica que os hidratos de carbono produzidos são translocados para o crescimento reprodutivo em vez de serem armazenados (Swain & Darnell, 2001).

5.7.2. Nas framboesas

Na framboesa, as raízes e as primocanes são os órgãos responsáveis pelo armazenamento hidratos de carbono durante o inverno, embora no final do ciclo as raízes sejam o órgão que contém maiores concentrações de hidratos de carbono de reserva (Crandall, 1995).

No início do novo ciclo cultural, quando as primocanes e as raízes começam a crescer simultaneamente, a necessidade pelos hidratos de carbono armazenados aumenta, existindo uma competição entre estes dois órgãos (Fernandez & Pritts, 1993). O crescimento dos lançamentos do ano (primocanes) inicialmente dependem das reservas do sistema radicular (Oliveira et al., 2007), durante esta fase, há uma diminuição contínua do peso seco da raiz, gasto de hidratos de carbono, pois são estas as reservas que apoiam as primocanes durante o abrolhamento e o início da floração (Fernandez & Pritts, 1993; Oliveira et al., 2007) este gasto de reservas só cessa, quando as folhas das primocanes começam a ser a nova source, pois, neste momento a sua taxa fotossintética é suficiente para fornecer hidratos de carbono para os frutos que se

desenvolvem (Privé et al., 1993). Pode-se observar na (**Figura 12**), o impacto das folhas representativamente na oscilação da concentração de hidratos de carbono nas floricanes e primocanes, e observando também que as raízes são o principal órgão de reserva de hidratos de carbono, sobrepondo-se aos outros órgãos em estudo. No período de frutificação, os frutos são a sink mais forte, captando para si os hidratos de carbono, refletindo a baixa concentração nos outros órgãos.

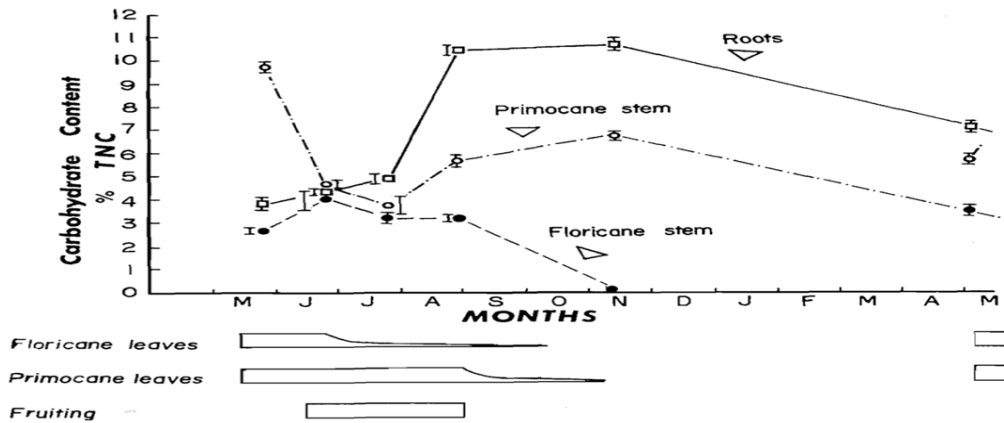


Figura 12- Desenvolvimento da framboesa, juntamente com a variação sazonal dos hidratos de carbono. Adaptado de (Whitney, 1982).

Entre Maio a Julho as folhas das primocanes funcionam como sink, utilizando parte dos fotoassimilados sintetizados pelas floricanes, devido à translocação destes para a raiz (Brierley & Landon, 1936).

A partir do mês de Julho e conseqüente diminuição da parte aérea das primocanes e floricanes, o peso seco das raízes começa a aumentar juntamente com a sua concentração hidratos de carbono (Fernandez & Pritts, 1993).

As raízes atuam como source de hidratos de carbono para o crescimento reprodutivo inicial das floricanes e o crescimento vegetativo inicial das primocanes (Fernandez & Pritts, 1994; Whitney, 1982). Com o desenvolvimento do ciclo da planta, as raízes vão ser a nova sink, obtendo hidratos de carbono sintetizados pelas primocanes e floricanes (Fernandez & Pritts, 1994).

Porém, segundo (Raya, 2006), quando existe uma produção maior nas floricanes, elas começam a exportar menos hidratos de carbono para as raízes, comparativamente às floricanes com menos produções, o que pode ser comparado com os mirtilos, isto é, na

altura da frutificação o fruto atua como a sink mais forte, consumindo a maioria dos hidratos de carbono e inibindo a sua translocação para os outros órgãos.

Num estudo realizado por (Dalman, 1989) na redução das primocanes observou-se o aumento de produção de frutos em comparação com as plantas em que, as primocanes foram mantidas, durante a frutificação das floricanes. Por outro lado, o número de primocanes aumenta significativamente, quando as floricanes (ou inflorescências) são removidos (Vasilakakis & Dana, 1978). Nos trabalhos anteriormente retratados o que esteve em estudo foi a translocação de fotoassimilados, não as oscilações dos hidratos de carbono propriamente ditos, porém os autores acreditam que possivelmente existirá competição de hidratos de carbono entre órgãos das plantas.

Ao longo do ciclo cultural ocorre uma grande variação das reservas nas raízes: normalmente decrescem durante o abrolhamento e na fase inicial do ciclo de crescimento e reprodutivo, e aumentam mais tarde no ciclo, normalmente após o cessar do ciclo de crescimento e maturação dos frutos, quando se dá o atempamento e a entrada em dormência, com a redução do conteúdo em água dos lançamentos (Oliveira et al., 2007).

Em condições de dormência das framboesas a concentração de amido é mínima na parte aérea nos meses de Novembro a Fevereiro, sendo nessa altura que as raízes possivelmente possuem a sua concentração máxima (Whitney, 1982). A acumulação do amido inicia-se quando o crescimento da raiz aumenta, na altura em que as plantas estão em plena floração e frutificação, acumulando até ao Outono (Fernandez & Pritts, 1994). O teor de amido decresce no decorrer do inverno devido a atividade das enzimas que hidrolisam em açúcares solúveis (Whitney, 1982).

A desfoliação prematura de lançamentos de framboesa diminui as reservas de amido e açúcar e aumenta a suscetibilidade dos gomos em ficarem danificados fisiologicamente devido as baixas temperaturas (Palonen, 1999a).

6. MATERIAIS

6.1. Caracterização da região

6.1.1. Localização

As amostras de raízes de plantas de mirtilo são provenientes da Herdade Experimental da Fataca, à latitude de 37°30'N e à longitude de 8°45'O. As plantas de framboesa são provenientes da empresa First Fruit situada em Boa Vista dos Pinheiros, á latitude de 37°35'05``N e à longitude de 8°40'36``W, ambos os locais pertencentes ao concelho de Odemira, zona conhecida por excelência na produção de pequenos frutos.

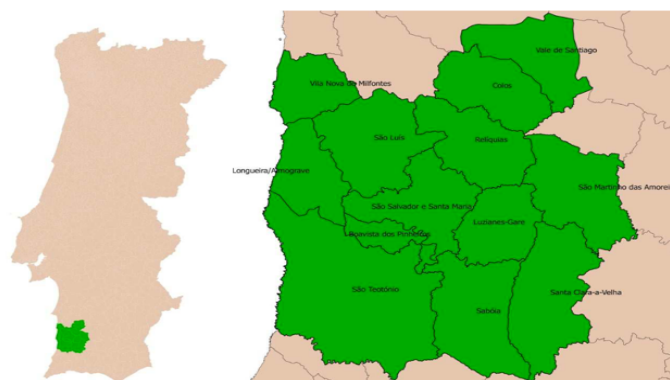


Figura 13-Localização geográfica do concelho de Odemira (Odemira Município, 2016).

Os trabalhos laboratoriais foram realizados na unidade de investigação, no departamento de Química, do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) (determinação de Açúcares por HPLC) e no Instituto Superior de Agronomia (ISA), (Determinação de Amido).

6.1.2. Condições climáticas

Dada a sua localização geográfica, Odemira, possui um clima temperado com características mediterrânicas, dada a sua proximidade do mar. De acordo com a classificação de Köppen (Ipma - Instituto Português do Mar e da Atmosfera, 2016) é um clima do tipo Csb (Clima temperado, de verão seco e suave).

No ano de 2016, as temperaturas médias anuais situaram-se entre 16 e 17°C, no verão entre Junho e Setembro as médias mensais rondaram os 20- 23°C e no inverno de Dezembro a Fevereiro ficaram entre os 11°C e os 14°C, no entanto pode existir a ocorrência de picos anuais de temperatura, que podem fazer variar as temperaturas entre os 0 a -2°C (no interior em Janeiro Fevereiro) e os 40°C entre Julho a Setembro (**Figura 14**). Estas temperaturas, como foi referido anteriormente, influenciam o

desenvolvimento das plantas e o conseqüente gasto e ganho de reservas no que diz respeito a reservas açucaradas.

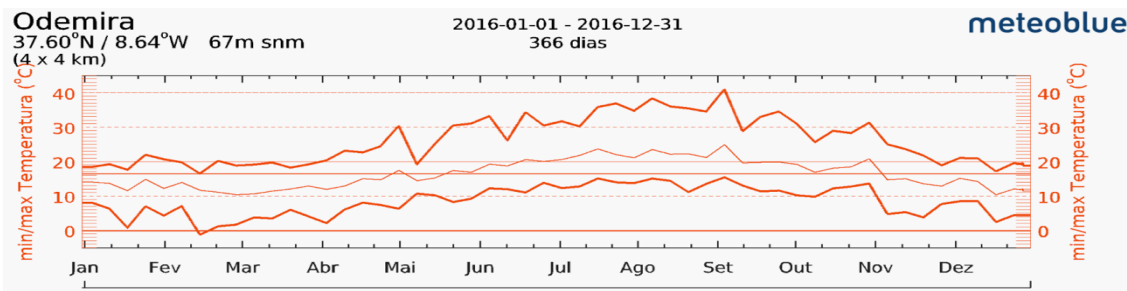


Figura 14- Características climáticas de Odemira no ano de 2016 (meteoblue, 2016)

6.2. Colheita das amostras

6.2.1. Mirtilos

O ensaio foi dividido em três épocas de colheita de raízes de mirtilo, nos dias 22 de Março, 31 de Maio e 17 de Novembro de 2016, correspondentes ao início de produção, produção mais acentuada e final do ciclo de crescimento. Foram estudadas quatro variedades de mirtilo, três correspondentes a mirtilos do Sul (SHB)- Star, Paloma e O'Neal, e uma variedade de carácter intermédio/Norte- Legacy.

Em cada época de colheita foram utilizadas três plantas de cada cultivar, perfazendo 12 plantas por data de colheita e um total de 36 plantas no final do estudo. As plantas em estudo foram plantadas em vaso em Março de 2012, tendo, à altura deste estudo 4 anos de idade.

6.2.2. Framboesas

O ensaio foi dividido em quatro épocas de colheita de raízes de framboesas. As plantas das diferentes colheitas amostrais foram plantadas a 30 de março de 2016 e são provenientes de gomos de raiz. As plantas propagadas por gomos de raiz podem produzir primocanes menos vigorosas e, especialmente, menor altura de lançamentos e menor densidade de laterais, devido à menor quantidade de reservas de hidratos de carbono armazenados, os dois importantes componentes de produção que afetam a produção de framboesa de primocane em anos subsequentes (Heide & Sonstebly, 2011).

A primeira época de colheita foi no dia 27 de Abril, a segunda colheita no dia 23 de Maio, terceira dia 30 de Junho e a quarta colheita no dia 16 de Dezembro de 2016,

correspondendo ao início de crescimento vegetativo, crescimento vegetativo intermédio, final de crescimento vegetativo e final de crescimento reprodutivo (cessar da produção).

Em cada época de colheita foram utilizadas três plantas de cada cultivar, perfazendo 6 plantas por data de colheita e um total de 24 plantas no final do estudo.

6.3. Condições das plantas de mirtilo e framboesa

As plantas de mirtilo encontram-se em vasos de 25 litros, com substrato Siro® Ácido, sendo este um substrato especial para plantas acidófilas, as suas principais características são a nível de pH, compreendido entre 4 a 4,5 e uma elevada percentagem de matéria orgânica mais de 70%. As plantas de framboesas encontram-se em vasos de 10 litros, com substrato fibra de coco standard da empresa Legro. As adubações tanto nos mirtilos como nas framboesas são feitas por fertirrega sendo utilizada em cada caso uma solução padrão. As culturas encontram-se em condições de culturas protegidas, túnel no caso das framboesas e estufa em caso dos mirtilos.

7. Métodos

7.1. Identificação e quantificação dos açúcares simples com base no método de HPLC

A técnica usada neste trabalho foi a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, sigla inglesa de High-Performance Liquid Chromatography). Esta técnica pode ser aplicada na identificação e quantificação de qualquer composto que apresente solubilidade num líquido e possa ser utilizado como fase móvel (Ribani et al., 2004). A utilidade de uso da HPLC é vasta, nomeadamente, na análise de vários compostos, incluindo os ácidos orgânicos, as vitaminas, os aminoácidos, flavonoides, certos pesticidas, ácidos gordos, pigmentos, açúcares entre outros (Sequeira, 2012).

A cromatografia por HPLC apresenta várias vantagens, pois permite automatizar o sistema, reduzir o tempo de análise, efetuar análises qualitativas e quantitativas, bem como, ter reprodutibilidade de dados e boa detetabilidade a diferentes comprimentos de onda (Ribani et al., 2004)

Tem também algumas desvantagens devido ao facto do equipamento e a sua manutenção ser dispendiosa, de ser um sistema complexo, apresentar baixa

sensibilidade perante alguns compostos e ser dependente da experiência do operador (Ribani et al., 2004).

7.1.1. Procedimento

Os açúcares livres, nomeadamente sacarose, glucose, frutose e rafinose, presentes nas raízes de mirtilo e framboesa, foram analisados por Cromatografia Líquida de alta Resolução (HPLC) com base na Norma 80-04.01 (cereais) e (Palonen, 1999a) com algumas adaptações.

Foram pesados cerca de 500 mg de raízes de mirtilo e framboesa previamente liofilizadas, para um tubo Falcon de 17 mL. Foi adicionado 5mL de etanol (ETOH) a 80%, tendo-se colocado o tubo num banho termostaticado (Selecta, Unitronic-OR) a 70°C durante 10 min. Colocou-se, o tubo Falcon num agitador orbital (Thermolyne, Aros 160) durante 15 min, tendo sido centrifugado a 5000 rpm durante 15 min (Centrífuga Sigma, 2K15). O sobrenadante foi recolhido para um balão de fundo redondo. O resíduo foi utilizado em mais duas extrações, repetindo-se o processo anteriormente descrito. Os sobrenadantes resultantes foram combinados para o balão de fundo redondo de 50 mL.

O solvente foi evaporado à secura, a 40°C num rotavapor (Büchi R-114), tendo-se reconstituído o resíduo para balão volumétrico de 1 mL com eluente, acetonitrilo e água na proporção (75:25), na separação cromatográfica. O sobrenadante foi filtrado com seringas e filtros (Millipore) de 0,22 µm para eppendorfs e guardado a -20°C. As amostras foram analisadas, num sistema cromatográfico (Hitachi, L-2130), equipado com bomba quaternária, forno de coluna (Merck Lachrom, L-7350, injetor manual (Merck Hitachi, Lachrom) e detetor RI (Merck Hitachi, L-7490), interface (Merck-Hitachi D-7000). A separação foi realizada em modo isocrático coluna de fase normal (Merck, Purospher ®Star NH₂), 250 cm de comprimento, 4 mm de diâmetro e 5µm de porosidade à temperatura de 30°C. A fase móvel era constituída por Acetonitrilo (Sigma) e água (Milli-Q), (75:25, v/v), foi usada fluxo de 0,7 mL/min, durante 30 min. Cada amostra foi injetada por três vezes (repetições), 20 µl de cada extrato de cada amostra.

A identificação dos hidratos de carbono presentes em cada amostra de raízes em estudo foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos nessa amostra com cromatogramas de padrões. Nesses padrões, o elemento em questão (hidrato de carbono) é eluído nas mesmas condições da amostra a ser analisada, originando a formação de um pico num determinado tempo, sendo esse período chamado de tempo

de retenção, os hidratos de carbono presentes nas raízes identificados pela comparação entre os tempos de retenção, da amostra e os tempos de retenção dos padrões. Os cromatogramas são gráficos do tempo em minutos pela resposta do detetor.

A quantificação dos açúcares presentes nas raízes de mirtilo e framboesa foi realizada através da construção de uma curva de calibração externa preparada a partir de uma solução padrão realizada com Sacarose (AnalaR), Frutose (Merck), Glucose (Merck) e Rafinose (Bacto), tendo sido realizadas seis diluições das mesmas 0.2, 1, 3, 5, 7, 8 (mg/ml) e injetaram-se 20 µL de cada diluição. As curvas de calibração de cada uma das soluções padrão foram construídas colocando, em ordenada, as áreas obtidas após injeção das soluções padrão e as concentrações, das mesmas, em abcissas.

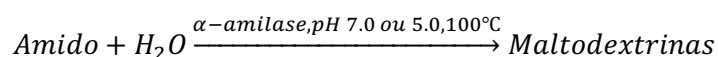
A equação das respetivas retas permitiu determinar a concentração de cada açúcar presente nas raízes de mirtilos e framboesas com base nas áreas dos respetivos picos.

Todos os valores de áreas e tempos de retenção das amostras foram obtidos com auxílio do software EZChrom Elite.

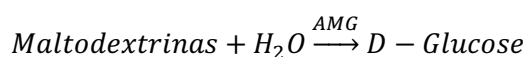
7.2. Determinação da percentagem de amido nas raízes de mirtilo e framboesa

A determinação do amido das raízes seguirá o método “Amyloglucosidase/ α -amylase method” do kit da Megazyme. O kit é baseado no uso da amiloglucosidase (AMG) e da α -amílase termoestável. Este método baseia-se numa série de reações enzimáticas em que, inicialmente, o amido é convertido a maltodextrinas pela α -amílase (Eq.1) e, posteriormente, estas são convertidas a D-glucose pela amiloglucosidase (Eq.2). Por fim, a D-glucose é convertida pela glucose oxidase a D-gluconato com libertação de peróxido de hidrogénio (Eq.3) cuja presença é quantificada por uma reação colorimétrica (Eq.4).

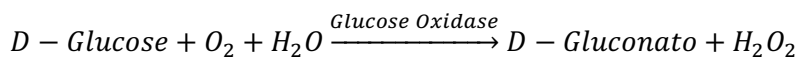
Equação 1:



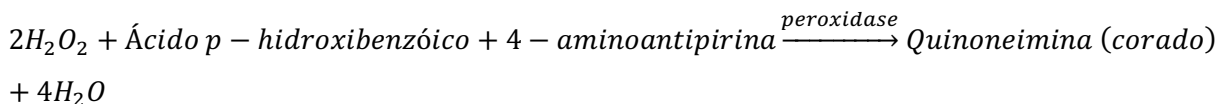
Equação 2:



Equação 3:



Equação 4:



7.2.1. Procedimento

Para extração do amido, foram pesados cerca de 100mg de raízes de mirtilo e framboesa previamente liofilizadas, para um tubo Falcon de 17mL. Foi adicionado 5mL de etanol (ETOH) a 80%(V/V), tendo-se colocado o tubo em banho termostatizado (Julabo Shake Temp SW 22) a 80°C-85°C durante 5 minutos. Posteriormente, o preparado foi agitado em vórtex (Velp ZX³), adicionaram-se mais 5 mL de etanol e centrifugou-se por 10 minutos a 5000 rpm, numa centrífuga (Hermle Z 383 K). Após centrifugação, o sobrenadante foi eliminado, ressuspendeu-se o resíduo em 10 mL de etanol a 80% e centrifugou-se de novo nas condições referidas anteriormente. Por fim, eliminou-se o sobrenadante e obteve-se o resíduo final.

A quantificação do amido no resíduo obtido foi iniciada com a adição de 3 mL de α -amílase, preparada previamente. Colocou-se o preparado em banho termostatizado a 100°C durante 12 minutos, agitando-se no vórtex aos 4, 8 e 12 minutos. Terminados os 12 minutos, reduziu-se a temperatura do banho termostatizado para 50°C mantendo-se o preparado no banho termostatizado até a temperatura estabilizar.

De seguida, adicionou-se 0,1 mL de amiloglucosidase e agitou-se em vórtex. Posteriormente, colocou-se em banho termostatizado a 50°C por 30 minutos e, de seguida, preencheu-se o tubo Falcon que continha a solução com água destilada até aos 10 ml. A solução foi agitada e colocada em centrifugação durante 10 minutos a 5000 rpm à temperatura ambiente, no final, prepararam-se tubos de vidro com 0,1 mL do sobrenadante fazendo sempre duplicados. Para além destes tubos, são preparados um tubo padrão de glucose com 0,1 mL de D-glucose e um branco com 0,1mL de água destilada. A todos os tubos foram adicionados 3 mL de reagente GOPOD e colocados em banho termostatizado a 50°C por 20 minutos.

Por fim, foi lida a absorvância de 1mL de solução de cada um dos tubos preparados (em cuvettes de 1 cm de poliestireno comuns) a 510nm contra o branco, num espectrofotômetro Shimadzu modelo UV – Visible Recording Spectrophotometer UV-2100, acoplado a um computador modelo City Desk.

O cálculo da percentagem de amido foi efetuado segundo a fórmula, retratada no Kit:

Fórmula:

$$\text{Amido(\%)} = \Delta A \times F \times \frac{FV}{0,1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = A \times \frac{F}{W} \times FV \times 0,9$$

Legenda:

ΔA – Absorvância lida contra o branco.

F – Conversão da absorvância para μg ($\frac{100}{\text{absorvância da glucose}}$)

FV – Volume final.

0,1 – Volume de amostra analisado.

$\frac{1}{1000}$ - Conversão de μg para mg.

$\frac{100}{W}$ – Fator de conversão de amido em percentagem de peso.

$\frac{162}{180}$ - Ajuste da D-glucose livre para D-glucose anidra (forma que surge no amido).

7.3. Parâmetros adicionais

Para uma melhor análise das oscilações dos hidratos de carbono presentes nas raízes, durante as diferentes datas de colheita de amostras, foram avaliados alguns parâmetros adicionais.

Nos mirtilos foram feitas avaliações de estado fenológico para cada planta de cada variedade, o estado fenológico foi determinado para a totalidade da planta, uma vez que a raiz suporta o crescimento total da planta, e uma avaliação restrita a um só ramo poderia não demonstrar o desenvolvimento da própria planta.

A produtividade foi outro parâmetro analisado na cultura do mirtilo, uma vez que se conseguiu acompanhar o seu ciclo reprodutivo, as colheitas foram realizadas semanalmente.







Na cultura da framboesa foi analisado o estado fenológico na totalidade da planta com o intuito de se poder demonstrar melhor as oscilações dos hidratos de carbono nas raízes; o outro parâmetro analisado nas framboesas foi a matéria seca, mais precisamente o peso seco da parte aérea ao longo das datas de colheita de amostras. A parte aérea foi cortada em pedaços mais pequenos, colocados em caixas de alumínio e inserido numa estufa de secagem Memmert a 70°C durante 48 horas, nas framboesas não foi analisada a produtividade uma vez que as plantas se encontravam muito jovens ainda no início do ciclo vegetativo.

7.3.1. Estado fenológico dos mirtilos

Para melhorar enquadrar os doseamentos dos açúcares obtidos, apresenta-se de seguida uma descrição das diferentes datas de colheita das amostras de mirtilo (**Quadro 1**), tendo como suporte a escala fenológica da Universidade de Michigan, EUA e escala BBCH (Santos, 2015).

Na primeira data de colheita de amostras de raízes, correspondente ao dia 22 de Março de 2016, as plantas de mirtilo encontravam-se globalmente a iniciar a produção. O estado fenológico das diferentes variedades não foi determinado apenas por um único ramo, mas sim pela observação da totalidade da planta, esta determinação levou a que dentro da mesma planta, se verificasse diferentes estados fenológicos.

Quadro 1. Descrição e ilustração das variedades de mirtilo na 1ª data de colheita amostral.

<u>Data</u>	<u>Imagem</u>	<u>Estado fenológico</u>	<u>Descrição</u>	<u>Variedades</u>
<u>22/3/16</u>		67/69	Queda das corolas, fim da floração e vingamento dos frutos	O'Neal
		71	Crescimento dos frutos, podendo se observar bagas grandes a tamanho de ervilhas	Legacy O'Neal
		78	Fruto verde, cerca de 80% das bagas atinge o seu tamanho final.	Legacy O'Neal Paloma Star
		81	Início da Maturação/Coloração, as bagas começam a mudar de cor verde para rosa escuro e depois azul.	Paloma Star
		83	10% dos frutos maduros, começam a ficar moles e a tonalidade azul sobressai	Paloma Star
		85	25% frutos maduros. Esta fase pode coincidir com a primeira colheita de bagas maduras	Paloma Star





Observando o quadro anterior podemos verificar que fenologicamente as variedades O'Neal e Legacy estão menos desenvolvidas, fenologicamente relativamente à variedade Paloma sendo esta juntamente com a Star as variedades mais desenvolvidas.

De realçar que a ajuda na obtenção dos estados fenológicos foi feita visualmente e através da ajuda das pessoas que colhiam os frutos maduros, pois por vezes as plantas demonstravam um estado fenológico anterior e verdadeiramente era o estado fenológico seguinte, isto deve-se a colheita semanal dos frutos maduros.

A segunda data de colheita (**Quadro 2**) de amostras de raiz, no dia 31 de Maio de 2016, corresponde à operação cultural da poda nomeadamente nas variedades Legacy e O'Neal, estando a Paloma e Star já podadas.

O estado fenológico correspondente à escala 31, observado nas variedades Paloma e Star, pode dever-se à eliminação do gomo terminal e conseqüente desenvolvimento dos gomos abaixo deste.


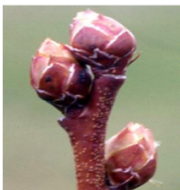



Quadro 2- Descrição e ilustração das variedades de mirtilo na 2ª data de colheita amostral.

<u>Data</u>	<u>Imagem</u>	<u>Estado fenológico</u>	<u>Descrição</u>	<u>Variedades</u>
<u>31/5/16</u>		83	10% dos frutos maduros	Legacy O'Neal
		85	25% frutos maduros.	Legacy O'Neal
		00	Iniciação dos gomos florais/foliares, da campanha seguinte	Paloma Star
		31	Saída das folhas, folhas emergem dos gomos foliares	Paloma Star

No dia 17 de Novembro de 2016 (**Quadro 3**), realizou-se a última colheita de amostras. Este dia de colheitas é mais espaçado relativamente ao dia da segunda colheita, o objetivo é atingir a colheita de amostras no início do desenvolvimento reprodutivo, de modo a poder analisar o comportamento dos hidratos e carbono nesta fase. De notar que as plantas possuem um carácter diferenciado por se encontrarem em estufa

Podemos voltar a observar que as variedades O'Neal e Legacy continuam fenologicamente menos desenvolvidas que as outras duas variedades.

Quadro 3- Descrição e ilustração das variedades de mirtilo na 3ª data de colheita amostral.

<u>Data</u>	<u>Imagem</u>	<u>Estado fenológico</u>	<u>Descrição</u>	<u>Variedades</u>
17/11/16		00/97	Gomo dormente, sem sinais visíveis de desenvolvimento.	Legacy O'Neal
		51	Inchamento do gomo florais, começam a expandir-se sendo visíveis as escamas mais claras do interior	Star
		57	Gomos iniciais rosa, as corolas adquirem esta tonalidade, existe alongamento, no entanto permanecendo ainda fechadas	Paloma Star
		59	Gomos finais rosa, as corolas atingem o tamanho final, a maioria das flores da inflorescência estão completamente separadas	Paloma Star
		61	Início da floração Cerca de 10% das flores já estão abertas.	Paloma Star

7.3.2. Evolução da produção dos mirtilos

Na figura que se segue (**Figura 15**) as linhas verticais representam a primeira e segunda colheita de raízes respetivamente, o dia 22 de Março de 2016 e o dia 31 de Maio de 2016; a terceira data, correspondente ao dia 17 de Novembro, não está representada no gráfico, pois já não existia produção nesse momento.

As colheitas de mirtilos foram semanais, (a falta de ligação entre produções semanais, é devido à reduzida produção, facto que levou à passagem de frutos de uma semana para a semana seguinte).

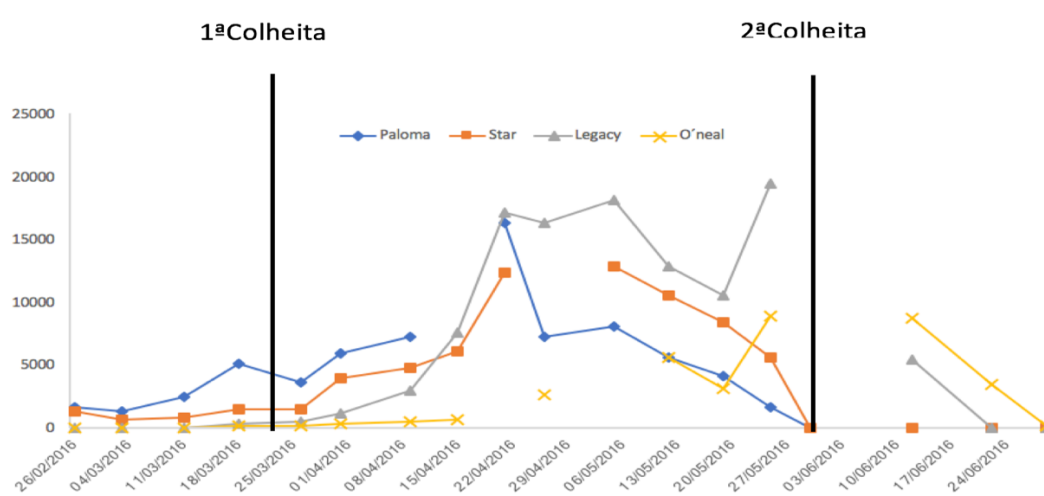


Figura 15- Gráfico de Produção (gramas) das diferentes variedades de mirtilo ao longo do ciclo reprodutivo.

Estas colheitas amostrais de raízes foram delineadas nestas datas de modo a que existisse um paralelismo entre variedades, o que não se revelou fácil, visto que as produções entre variedades não são similares, isto é, quando uma variedade atinge o seu pico de produção não quer dizer que as outras variedades em estudo atinjam esse mesmo pico. A título de exemplo, na segunda colheita amostral, a variedade Legacy atingiu uma produção máxima e as variedades Star e Paloma terminaram a sua produção.

Devido a este fator, decidiu-se fazer uma colheita no início de produção das variedades, a segunda colheita na fase mais decrescente de produção e a última colheita no início do desenvolvimento reprodutivo, de maneira a poder observar a mobilização dos hidratos de carbono durante estas fases.

7.3.3. Estado fenológico das framboesas

De modo análogo ao representado para os mirtilos, apresenta-se uma breve descrição das diferentes datas de colheita das amostras de Framboesa, tendo como suporte a escala fenológica (Karin et al., 2001).

As variedades de framboesa em estudo são bastante idênticas, no entanto a Kweli está ligeiramente adiantada (planta da esquerda) em relação à Kwanza (planta da direita), contudo a planta Kweli ainda se enquadra na mesma escala BBCH que a planta Kwanza (**Figura 16**).

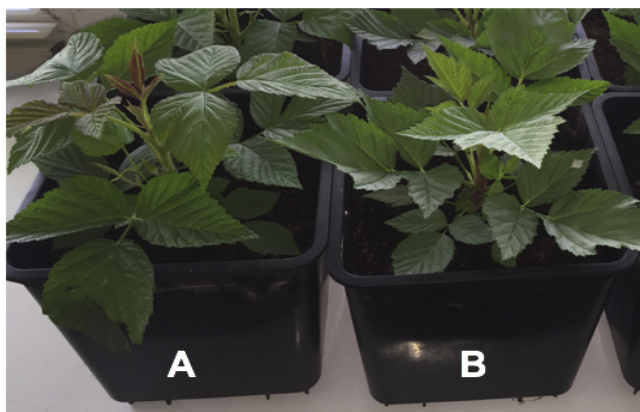




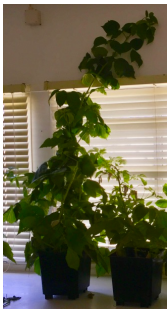


Figura 16. Plantas de Kweli e Kwanza na primeira data de colheitas amostrais

No quadro seguinte (**Quadro 4**) podemos observar o estado fenológico correspondente a cada data de colheita de amostras de raízes de framboesa.

Nas variedades de framboesas, na primeira, segunda e terceira datas de colheita de amostras, observa-se que o estado fenológico se mantém bastante constante, porém a variedade Kwanza destaca-se por um desenvolvimento menor dentro do mesmo estado em relação a Kweli, podendo observar-se que na quarta data de colheita, 16/12/16, a Kweli cessou a produção de frutos e a Kwanza ainda esta na fase final de produção.

Segundo a responsável pela produção de framboesas na empresa First Fruit, a nível produtivo a Kweli destaca-se em relação à Kwanza. Na produção em primocanes, a Kweli produz 15t/ha, mais 5 toneladas do que a Kwanza.

Quadro 4. Descrição e ilustração das variedades de framboesa nas respectivas datas de colheita amostral.

<u>Data</u>	<u>Imagem</u>	<u>Estado fenológico</u>	<u>Descrição</u>	<u>Variedades</u>
<u>27/4/16</u>		13	Seis ou mais folhas desdobradas	Kweli Kwanza
<u>23/5/16</u>		33	30% do crescimento longitudinal máximo alcançada (75 cm)	Kweli Kwanza
<u>30/6/16</u>		51	Primeiro os botões tornam-se visíveis	Kweli Kwanza
<u>16/12/16</u>		89	Kwanza apresenta ainda alguns frutos	Kwanza
		90	Final de produção	Kweli

7.3.4. Evolução da matéria seca das framboesas

Observando os seguintes gráficos podemos verificar que a variedade Kweli, durante as quatro datas de colheitas, apresenta sempre um maior peso de matéria seca relativamente à outra variedade em estudo, Kwanza.

O peso seco da parte aérea da primeira à quarta colheita, isto é, da passagem do estado fenológico 13 ao estado fenológico 89, as variedades tiveram um aumento de aproximadamente 100 vezes do seu peso seco inicial.

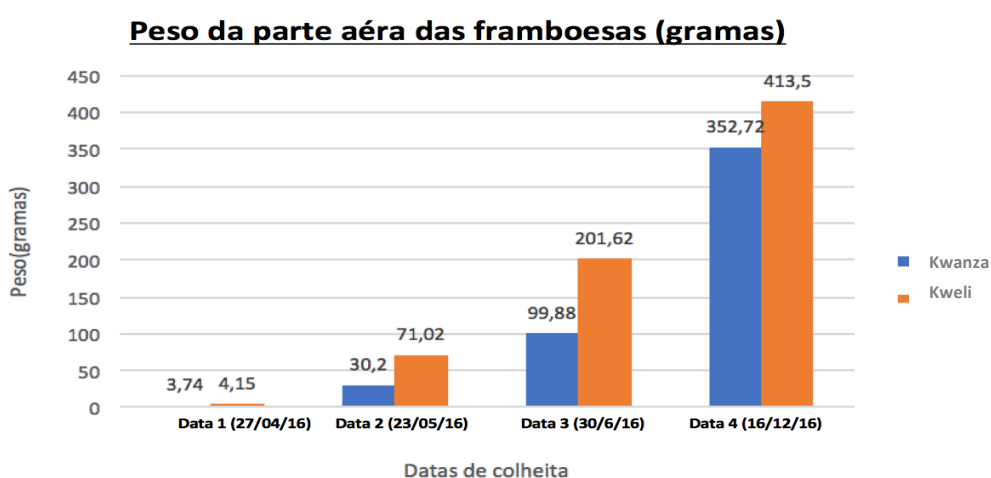


Figura 17- Evolução do peso seco (g) da parte aérea das framboesas em estudo ao longo do seu ciclo.

A análise de variância e subsequente comparação de médias (**Quadro 5**) revelou que há um aumento muito significativo na matéria seca de 1^a para a 4^a data, não havendo diferenças claras entre variâncias.

Quadro 5- Análise de variância ao peso seco (g) da parte aérea das framboesas em estudo ao longo do seu ciclo.

Variedades	1 ^a Colheita	2 ^a Colheita	3 ^a Colheita	4 ^a Colheita
Kwanza	3.7 C	30.2 C	99.9 BC	352.7 A
Kweli	4.2 C	71.0 BC	201.6 B	413.5 A

Relativamente as análises efetuadas às raízes (**Figura 18**), em cada planta de mirtilo foi retirada uma fatia do fundo do vaso correspondente a um volume de 6 359 cm³. Este volume total é composto por substrato, matérias inertes e raízes. Em seguida, as amostras vão ser armazenadas numa câmara frigorífica de maneira a evitar ao máximo de degradações. Posteriormente as raízes são lavadas, de modo a retirar todo o substrato e outros materiais inertes e para que, no final haja só raízes.

No laboratório, as raízes são cortadas e colocadas em copos de inox, juntamente com azoto líquido e postas a liofilizar, Ht 40 Beijer, durante 24 horas, a uma temperatura de -0,1°C e a uma pressão de 0,100 mBar. Após a liofilização, efetuou-se a pesagem e subsequente moenda com um moínho, IKA-Werk, munido de um crivo de 0,5mm, armazenando-se por fim o material em copos estanques de modo que não haja humidade nas amostras.

O processo de obtenção das raízes de framboesa moídas é idêntico ao processo das do mirtilo, exceto o corte de uma fatia de fundo do vaso, uma vez que nas plantas de framboesa foi usada a totalidade das raízes presentes nos vasos de 10 litros.



Figura 18- Processo de obtenção da amostra moída, para posterior utilização na obtenção da percentagem de amido e identificação e quantificação em HPLC, em mirtilo e framboesa.

7.4. Identificação dos hidratos de carbono simples nas raízes de mirtilo e framboesa.

A **Figura 19** corresponde a um cromatograma relativo à análise de uma solução padrão contendo quatro padrões, frutose, glucose, sacarose e rafinose, nas concentrações de 2 mg/ml; através deste cromatograma com base nos respetivos tempos de retenção, verificou-se que estes hidratos de carbono se encontravam presentes nos

cromatogramas das **Figuras 20 e 21** referentes as soluções de amostras de mirtilo e framboesa.

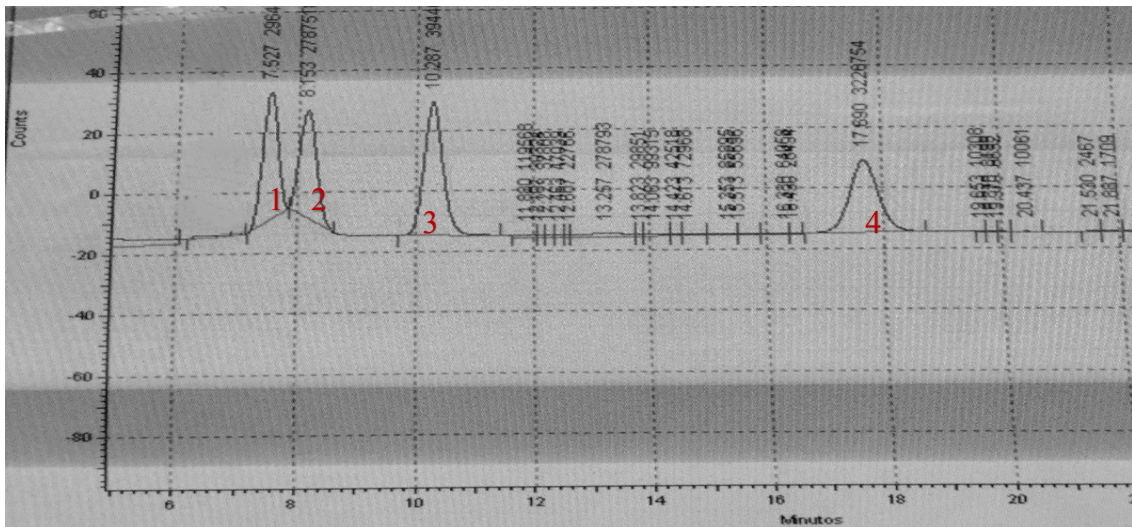


Figura 19- Cromatograma de uma solução padrão (2mg/ml) contendo 1- frutose (tr=7,527 min), 2- glucose (tr=8,153 min), 3- sacarose (tr=10,287min), 4- rafinose (tr=17,690 min)

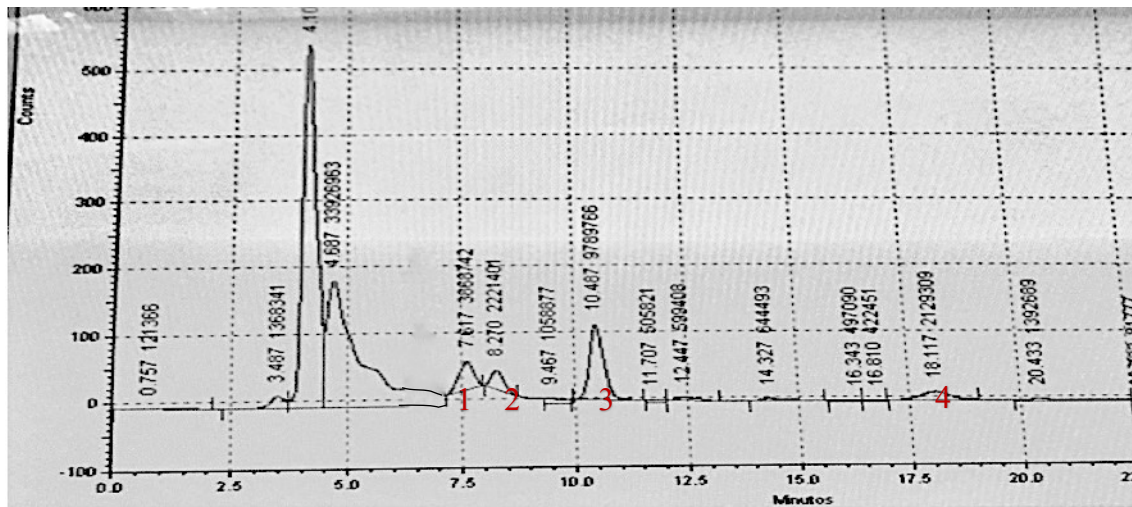


Figura 20- Cromatograma de uma amostra de mirtilo(3ªcolheita): 1-frutose (tr=7,617 min), 2-glucose (tr=8,210 min), 3- sacarose (tr=10,487min), 4- rafinose (tr=18,117 min).

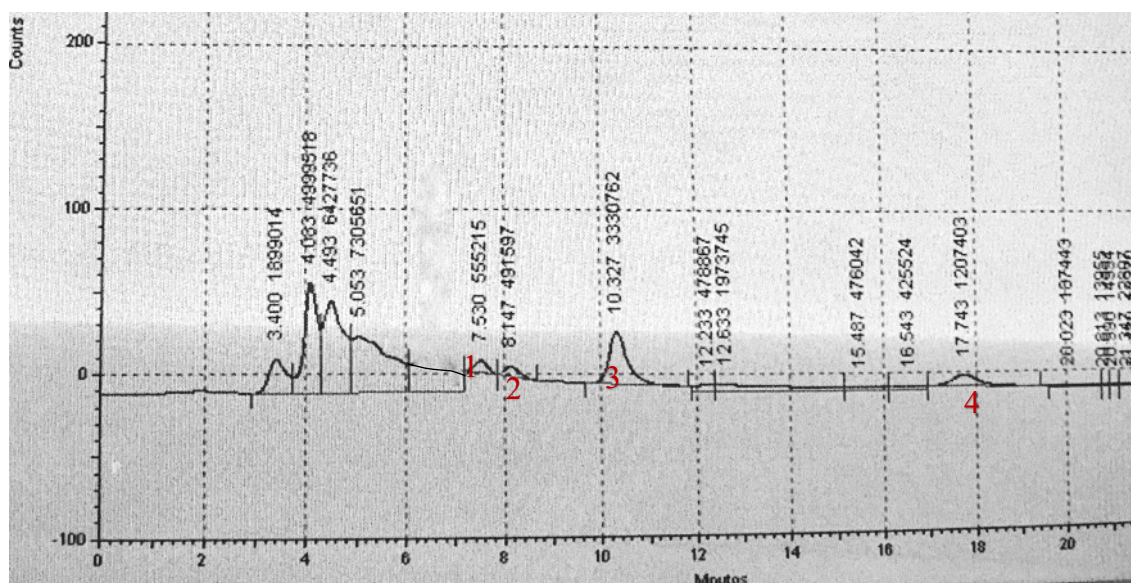


Figura 21- Cromatograma de uma amostra de framboesa(3ªcolheita): 1 – Frutose (tr=7,530 min), 2-glucose (tr=8,147 min), 3- sacarose (tr=10,327min), 4- rafinose (tr=17,743 min).

Sendo um dos objetivos deste trabalho a identificação dos hidratos de carbono presentes nas raízes de mirtilo e framboesa, esta foi feita (**Quadro 6**) por comparação com os tempos médios de retenção, obtidos em idênticas condições experimentais para as soluções padrão. O sorbitol não foi identificado, pois não existia nenhum pico associado ao tempo de retenção de 9,115 min nas amostras de framboesa e mirtilo.

Quadro 6- Tempos médios de retenção obtidos na análise de amostras e soluções padrão no sistema de HPLC

Coluna utilizada em HPLC	Compostos	Tempo de retenção das amostras(min)	Tempo de retenção dos padrões(min)
		média	média
Merck, Purospher ®Star NH ₂	frutose	7,759	7,660
	glucose	8,475	8,238
	sorbitol	ND	9,115
	sacarose	10,388	10,372
	rafinose	18,097	17,910

Com base nos tempos de retenção obtidos, pode verificar-se que as médias globais dos tempos de retenção das amostras e dos padrões são muito semelhantes, mas para se comprovar esta identificação procedeu-se a uma técnica complementar, a co-injeção, em que num tubo de eppendorf se adicionou 50µl de uma solução com um padrão individual de concentração de 2mg/ml, juntamente com 20µl da solução amostra e injetou-se no HPLC obtendo-se um cromatograma que evidencia a sobreposição de picos do padrão e da amostra.

A título de exemplo na **Figura 22** pode observar-se uma amostra de mirtilo sem adição de padrão (A) e a mesma amostra de mirtilo com adição do padrão rafinose na amostra (B). Analisando os cromatogramas, verificou-se uma passagem de 1374936 counts para 3142427 counts, um aumento de área significativo, quando adicionado o padrão à amostra; com este aumento de área pode afirmar-se que este hidrato de carbono esta presente nas amostras de mirtilo e framboesa. Efetuou-se o mesmo procedimento para os restantes padrões, verificando-se que existiu em todos um aumento significativo da área quando adicionado o respetivo padrão na amostra.

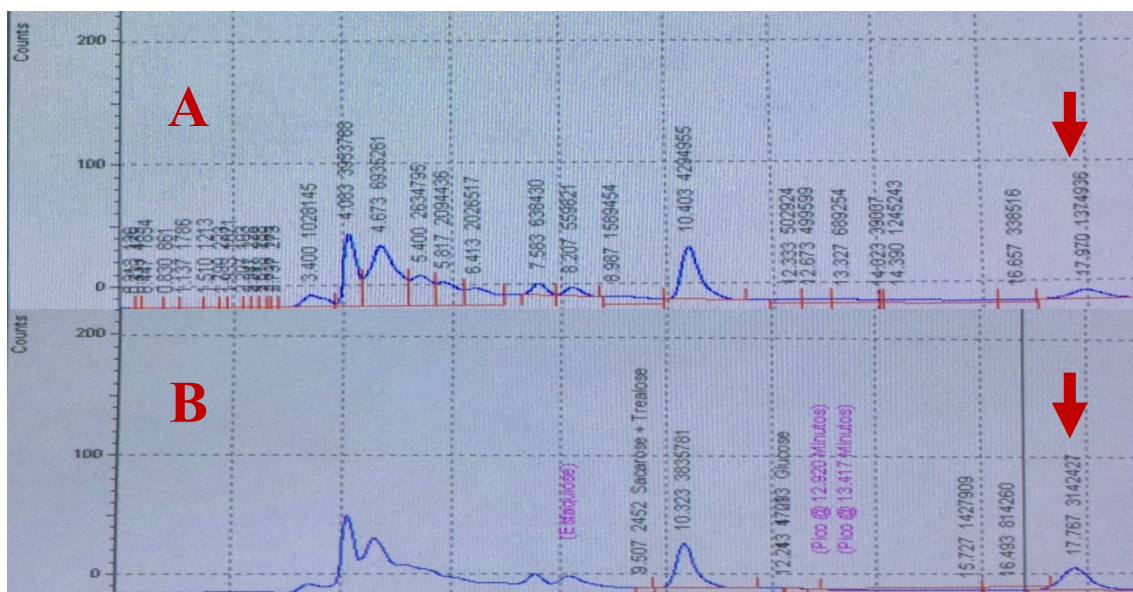


Figura 22- Cromatograma de uma amostra de mirtilo sem adição de padrão (A), comparativamente a um cromatograma da mesma amostra com adição de padrão (B) (rafinose 2mg/ml).

8. Estabelecimento de curvas de calibração para quantificação dos hidratos de carbono simples identificados.

As curvas de calibração para cada hidrato de carbono simples analisado em HPLC foram determinadas pela relação entre as áreas dos picos (counts) de cada hidrato de carbono e respectivas concentrações.

Na **Figura 23** está representada, como exemplo, a reta de calibração obtida da relação linear entre as áreas dos picos da rafinose e as respectivas concentrações usadas nas soluções padrão, assim como o respetivo valor de coeficiente de determinação. A mesma informação foi obtida nas calibrações referentes aos restantes hidratos de carbono analisados.

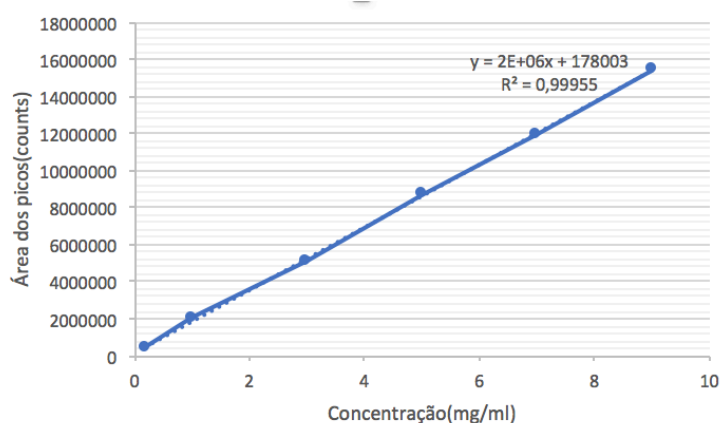


Figura 23- Reta de calibração obtida para a rafinose por HPLC

No **Quadro 7** apresentam-se os parâmetros da calibração obtidos para os diferentes hidratos de carbono, inclusive a rafinose, em HPLC.

Quadro 7- Parâmetros obtidos da calibração por regressão linear

Hidratos de carbono	Equação da reta de calibração	R ²	Limite de deteção(LD) (mg/ml)	Limite de quantificação(LQ) (mg/ml)
frutose	Y=2*10 ⁶ x-141682	0,999	0,194	0,591
glucose	Y=2*10 ⁶ x-78243	0,996	0,543	1,645
sacarose	Y=2*10 ⁶ x-60570	0,998	0,323	0,988
rafinose	Y=2*10 ⁶ x+178003	0,999	0,180	0,564

Y-área do pico; x-concentração dos hidratos de carbono nas amostras; R²-coeficiente de determinação

A frutose e rafinose são os hidratos de carbono que apresentam R^2 mais elevado (0,999 e 0,999 respetivamente), verificando-se um ajustamento linear mais adequado comparativamente com a sacarose de (R^2 de 0,998) e a glucose de com ($R^2= 0,996$) menos elevado, mas não menos aceitável.

O limite de deteção (**LD**) corresponde ao teor mínimo do analito que pode ser detetado, com uma validade estatística razoável; este valor poderá não ser quantificado, uma leitura inferior do LD não implica a ausência do analito.

Este parâmetro é expresso em unidades de concentração e mediante a utilização de uma reta de calibração é calculado pela equação:

$$LD = \frac{3.3 * S_{y/x}}{b}$$

Sendo:

$S_{y/x}$ - Desvio padrão residual da curva de calibração.

b- Declive da curva de calibração.

O limite de quantificação (**LQ**) representa a menor concentração do analito em estudo, que pode ser quantificada.

Tal como o LD, o LQ é expresso por uma equação:

$$LQ = \frac{10 * S_{y/x}}{b}$$

Sendo:

$S_{y/x}$ - Desvio padrão residual da curva de calibração.

b- Declive da curva de calibração.

Os LD variaram entre 0,194 e 0,543 mg/ml. Os valores mais baixos foram obtidos para a frutose e rafinose, os valores mais altos foram obtidos para a sacarose e glucose.

Os LQ variaram entre 0,564 e 1,645 mg/ml. Os valores mais baixos foram obtidos para a frutose e rafinose e os valores mais altos para a sacarose e glucose.

8.1. Doseamento de hidratos de carbono simples nas amostras de raízes de framboesa e mirtilo

8.1.1. Comentário breve às concentrações obtidas pela metodologia de HPLC para os hidratos de carbono simples nas raízes de mirtilo e framboesa e os seus limites de deteção e quantificação

Analisando simultaneamente os **Quadros 8 e 9** pode observar-se que existe concentrações de açúcares que estão abaixo dos LD e LQ, parâmetros associados a análises por HPLC.

Observando os dois quadros referidos, pode verificar-se que todos os hidratos de carbono são detetados pela metodologia de HPLC, exceto a rafinose na 2ª data na amostra da variedade Kweli e na 1ª data na amostra da variedade Legacy que estão abaixo do valor de deteção. Em alguns casos, a frutose e a glucose encontraram-se abaixo do limiar de quantificação. A glucose é apresentada como um hidrato de carbono que geralmente é detetado no sistema, porém encontra-se abaixo do LQ em alguns casos, o que poderá explicar-se por este açúcar apresentar o menor valor de R² das curvas de calibração.

Estes parâmetros são essenciais para uma melhor validação dos valores obtidos, pelo que estes resultados devem ser interpretados ainda como valores preliminares. A escassez de material disponível poderá ter contribuído para estas limitações.

Quadro 8- Quadro resumo relativo com as concentrações mg/g de Ms de raiz das variedades de mirtilo tendo em conta os LD e LQ.

		Mirtilos			
<u>Datas de colheita</u>	<u>Hidratos de carbono (mg/g de MS)</u>	<u>Paloma</u>	<u>Legacy</u>	<u>O'neal</u>	<u>Star</u>
1ª data	frutose	1,24	0,79	3,38	1,07
	glucose	1,26 D	0,76 D	3,01	0,98 D
	sacarose	4,80	2,79	18,33	3,88
	rafinose	0,58	0,14 ID	1,21	0,18 D
2ª data	frutose	1,78	0,92	0,80	1,64
	glucose	1,76	0,95 D	0,89 D	1,32 D
	sacarose	6,13	3,75	4,27	7,12
	rafinose	0,87	0,43 D	0,64	0,31 D
3ª data	frutose	0,65	0,71	0,62	1,05
	glucose	0,66 D	0,68 D	0,87 D	0,59 D
	sacarose	4,84	5,77	6,30	3,70
	rafinose	1,33	1,64	2,37	1,29

ID- inferior ao limite de deteção, no entanto não quer dizer que o hidrato de carbono não esteja presente na amostra; **D-** Detetado, mas inferior ao limite de quantificação.

Quadro 9. Quadro resumo relativo com as concentrações mg/g de Ms de raiz das variedades de framboesa tendo em conta os LD e LQ.

Datas de colheita	Hidratos de carbono (mg/g de MS)	Framboesa	
		Kwanza	Kweli
1ª data	frutose	1	1,01
	glucose	2,89	2,4
	sacarose	4,62	2,37
	rafinose	0,84	0,86
2ª data	frutose	4,73	1,46
	glucose	3,18	1,40 D
	sacarose	6,45	2,68
	rafinose	0,77	0,09 ID
3ª data	frutose	4,54	3,33
	glucose	2,91	2,09
	sacarose	10,19	10,08
	rafinose	1,89	2,13
4ª data	frutose	0,42 D	0,82
	glucose	1,24 D	1,88
	sacarose	13,72	11,57
	rafinose	2,82	2

ID- inferior ao limite de deteção, no entanto não quer dizer que o hidrato de carbono não esteja presente na amostra; **D-** Detetado, mas inferior ao limite de quantificação

9. Teores de hidratos de carbono determinados nas amostras de raízes de mirtilo e framboesa

Os resultados obtidos para as quantificações de hidratos de carbono simples foram tratados estatisticamente, recorrendo ao software Statistix 9, a um nível de significância $\alpha = 0,05$, analisando-se separadamente mirtilos e framboesas. De seguida foram realizadas diferentes análises de variância (ANOVA), com os objetivos de, identificar diferenças significativas entre as concentrações de hidratos de carbono das diferentes datas e/ou variedades de cada espécie e por fim, para analisar uma hipotética interação, das diferentes variedades nas diferentes datas.

Procedeu-se ao teste de Tukey, nos casos onde se observou diferenças significativas nas análises de variâncias ($p\text{-value} \leq 0,05$).

9.1. Mirtilo

A quantificação dos teores de amido nas diferentes cultivares de mirtilo e datas originou os resultados apresentados no **Quadro 10**. Analisando o comportamento das cultivares, em relação à variedade Paloma, é possível verificar que os teores de amido não variam inicialmente, mas aumentam significativamente da 1ª e 2ª colheitas para a terceira

colheita, tendo a Star um comportamento semelhante mas com teores mais baixos; em relação à O'Neal e Legacy, verificou-se uma diminuição (significativa na O'Neal) da 1ª para a 2ª data; este resultado pode dever-se ao facto das plantas desta, duas variedades apresentarem algum atraso fisiológico (78) em comparação com as outras duas variedades em estudo (85), não tendo ainda havido migração total para as raízes, aumentando depois novamente para a 3ª data.

Quadro 10- Comparação dos teores de amido das diferentes variedades de mirtilo e datas de colheita (mg/ 100mg de MS).

Variedades de Mirtilos	1ªcolheita (22/3/16)	2ªcolheita (31/5/16)	3ªcolheita (17/11/16)
Paloma	1,358 ef	1,868 ef	10,732 a
Legacy	1,423 ef	0,707 f	6,296 a
O'Neal	3,737 cde	0,433 f	4,444bcd
Star	1,973 ef	2,527 def	5,638 bc

Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$: letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA.

Em relação às datas de colheita, verifica-se que o teor de amido na terceira colheita é tendencialmente superior à das restantes colheitas. Nesta altura, as plantas independentemente das variedades, concentram-se na nova sink, a raiz, armazenando as reservas na mesma, de modo a que, no próximo ciclo, esta contenha as reservas suficientes para o início do seu desenvolvimento.

Relativamente à primeira colheita, a variedade O'Neal apresenta valores tendencialmente superiores aos das outras cultivares, mas sem diferenças estatisticamente significativas, algo que poderá estar relacionado com o seu carácter caducifólio e a sua tardia entrada em produção. As outras três cultivares manifestaram um comportamento próximo. Na 2ª colheita, os teores de amido foram semelhantes em todas as cultivares, coincidindo esta colheita com o cessar de produção por parte da Paloma. Na 3ª colheita, as cultivares Paloma e Legacy apresentaram teores de amido significativamente superiores às outras duas. A Paloma apresenta aproximadamente 10,7mg de amido por 100mg de matéria seca, um valor superior ao das restantes

variedades, este valor pode ser explicado por esta variedade ser a primeira a cessar a sua produção, ocorrendo a migração de reservas para as raízes.

As produções da O'Neal e Legacy prolongam-se em relação as das restantes variedades, a percentagem de amido na 3ª colheita por parte da O'Neal, é inferior relativamente à percentagem de amido da Legacy, algo que poderá ser explicado pela produção da O'Neal se prolongar mais em relação à da Legacy, visto que ambas apresentam a mesma escala fenológica (00/97).

Em relação aos açúcares de baixo peso moleculares os teores de sacarose mantiveram-se globalmente muito estáveis quer entre variedades, quer entre colheitas (**Quadro 11**), destacando-se apenas a O'Neal, com um valor na primeira colheita significativamente diferentes dos outros todos. A Star e a Paloma apresentam um comportamento semelhante ao longo do tempo, com subida tendencial da 1ª para a 2ª e depois descida para a 3ª colheita, a Legacy com tendência crescente ao longo do tempo.

O maior valor absoluto apresentado pela O'Neal pode estar relacionado com a sua natureza caducifolia.

Alguns autores sugerem que uma maior sensibilidade a baixas temperaturas, leva ao aumento das enzimas que degradam o amido, convertendo o amido em açúcares solúveis, nomeadamente, glucose, frutose e sacarose (Bonhomme et al., 2005; Sauter, 1988), sendo esta uma estratégia desenvolvida pelas plantas visando a sua sobrevivência a um rigoroso inverno devido a sacarose ser um crioprotetor mais eficaz do que os monossacarídeos (frutose e glucose), importante na regulação osmótica e proteção das proteínas em caso de desidratação (Bruni & Leopolo, 1992). Em arandos vermelhos, a sacarose correlacionou-se com a resistência ao frio e foi o principal hidrato de carbono, contribuindo para mudanças no teor de açúcares (Kaurin et al., 1981).

Para além disso, o facto de esta variedade estar atrasada fisiologicamente, uma vez que ainda não iniciou a produção de frutos, permite-lhe possuir níveis mais elevados de açúcares.

A variedade Legacy e a O'Neal iniciam o seu ciclo mais tardiamente, porém na primeira colheita apresentam valores significativamente diferentes, algo que pode ser explicado pelas suas diferenças fisiológicas. A variedade Legacy, sendo considerada por muitos autores uma variedade com carácter intermédio (Retamales & Hancock, 2012b), no que diz respeito as suas necessidades em frio, e também sendo uma variedade mais robusta, possivelmente, suporta melhor as baixas temperaturas. Na segunda colheita,

estas mesmas variedades não apresentam valores significativamente diferentes em relação às restantes variedades, porém os valores são os mais baixos e na terceira colheita os mais altos, algo que pode espelhar o facto de as variedades Paloma e Star se encontrarem mais adiantadas vegetativamente. Isto pode ser explicado por se encontrarem já em floração, uma vez que as cultivares se encontraram em cultura protegida e a translocação da sacarose é maior, pois possuem uma parte aérea maior, originando um crescimento mais elevados e uma elevada taxa de respiração.

Quadro 11- Comparação entre a interação de variedades e datas de colheita em relação à concentração de Sacarose (mg/g de MS).

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita
Paloma	4,796 b	6,132 b	4,836 b
Legacy	2,788 b	3,746 b	5,769 b
O'Neal	18,336 a	4,267 b	6,304 b
Star	3,878 b	7,122 b	3,702 b

Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA.

A sacarose é hidrolisada em glucose e frutose através de uma invertase alcalina (Godt & Roitsch, 1997), facilitando assim o seu transporte e utilização como energia no crescimento da planta. Desta forma, facilmente se relacionam os dados dos valores de sacarose **Quadro 11** com os de frutose **Quadro 12** e de glucose **Quadro 13**.

Analisando simultaneamente os **Quadro 12** e **13**, verifica-se que os valores dos dois hidratos de carbono em estudo, frutose e glucose, estão de acordo com o retratado bibliograficamente, isto é, a frutose e a glucose estão geralmente na proporção de 1:1 (Darnell, 1991). Tal apenas não se constata na terceira colheita da variedade Star, onde a glucose apresenta aproximadamente metade do valor da frutose. Os quadros refletem um comportamento tendencialmente muito semelhante dos dois açúcares nas diferentes cultivares, sendo a única nota dissemelhante os menores teores de glucose na Star na e 3ª colheita, quebrando um pouco a tendência.

Quadro 12- Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à concentração de Frutose (mg/g de MS).

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita
Paloma	1,238 bc	1,777 b	0,647 c
Legacy	0,791 bc	0,922 bc	0,708 c
O'Neal	3,376 a	0,797 bc	0,624 c
Star	1,070 bc	1,643 bc	1,049 bc

Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA.

Quadro 13- Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à concentração de Glucose (mg/g de MS)

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita
Paloma	1,257 bc	1,760 b	0,656 c
Legacy	0,757 c	0,947 bc	0,681 c
O'Neal	3,007 a	0,892 bc	0,873 bc
Star	0,975 bc	1,323 bc	0,589 c

Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA.

Nestes quadros os valores não são, em geral, estatisticamente diferentes quer entre datas de colheita quer entre cultivares, exceto no caso da variedade O'Neal, que apresenta um valor significativamente superior aos outros todos na primeira data, de acordo com a nota antes formulada. Estes valores podem ser suportados pelo mesmo verificado no **Quadro 11**.

Na terceira colheita das raízes, as variedades apresentam valores idênticos, não tão dispares como são verificados na primeira e segunda colheita, e bastante baixos. As plantas das variedades Legacy e O'Neal (**Quadros 12 e 13**), na primeira e segunda colheita apresentam os valores mais baixos relativamente à concentração de Frutose e Glucose, estes valores podem ser devido à sua produção ser mais prolongada e estarem mais atrasadas. Na terceira colheita, exceto a variedade Star que,

quantitativamente, possui um valor superior na concentração de frutose, as variedades possuem, um certo equilíbrio entre elas, não existindo valores díspares, algo que possivelmente pode ser explicado pelo estado fenológico e pela produção, isto é, Legacy e O'Neal estão no início de ciclo vegetativo, possuem gomos dormentes sem sinais visíveis de desenvolvimento e a sua produção prolongou-se em relação às outras variedades em estudo. A Paloma e Star já estão numa fase mais avançada do seu ciclo vegetativo e reprodutivo, existindo mesmo plantas com alguns cachos que apresentam já 10% de flores abertas, a sua produção já tinha terminado na data da segunda colheita. Pode observar-se que, nesta data mesmo com algum adiantamento do ciclo, as plantas apresentam um certo equilíbrio nas concentrações de glucose e frutose.

A rafinose atua como composto de reserva e, juntamente com a sacarose, é associada a criopreservação das células das plantas quando a temperatura é muito baixa e a planta começa a ter dificuldades em sobreviver (Palonen, 1999a).

Pode observar-se no **Quadro 14** que os valores são genericamente semelhantes entre cultivares e datas de colheita, com ligeira superioridade na cultivar O'Neal, na primeira colheita, em concordância com as observações dos açúcares, sobretudo na 3ª colheita, coincidindo com as concentrações de sacarose (**Quadro 11**). Nestas datas a O'Neal apresenta valores superiores, o que nos pode levar a concluir que esta variedade não é muito tolerante a baixas temperaturas e necessita de estratégias de sobrevivência, aumentando as concentrações de hidratos de carbono que atuam como criopreservadores. As outras cultivares apresentam valores mais baixos na 1ª data.

As quatro cultivares apresentam uma tendência de aumento ao longo do tempo. A variedades Legacy e Star apresentam genericamente valores mais baixos para a concentração de rafinose.

Quadro 14- Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à Rafinose (mg/g de MS).

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita
Paloma	0,582 b	0,867 ab	1,332 ab
Legacy	0,144 b	0,429 b	1,636 ab
O'Neal	1,206 ab	0,637 b	2,368 a
Star	0,180 b	0,312 b	1,294 ab

Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA.

Considerando os açúcares na sua totalidade, os valores apresentam-se globalmente estáveis (**Quadro 15**), quer em termos de cultivares quer em termos de data de colheita, com poucas diferenças com significado, destacando-se apenas a O'Neal na 1ª data, provavelmente devido às concentrações repetidamente maiores que nela se observaram para os diferentes açúcares, nomeadamente para a sacarose. Este valor poderá relacionar-se com o facto da mesma apresentar atrasos no desenvolvimento fenológico apresentando ainda queda das corolas, fim da floração e vingamento dos frutos 67/69), permitindo-lhe possuir mais hidratos de carbono. Na segunda data destacam-se a Paloma e Star (cessar de produção) e por último a Legacy e O'Neal apresentam valores superiores, algo explicado pelo seu atrasado desenvolvimento fisiológico

É de notar ainda que a tendência de acumulação de açúcares varia de cultivar para cultivar. Nas cultivares Paloma e Star, há um aumento da 1ª para a 2ª data, algo explicável pelo fim da produção em que a parte aérea investe no fornecimento de hidratos de carbono para a nova sink (raiz), seguindo-se uma descida para valores na 3ª data, próximos da 1ª data; nesta altura (**Quadro 10**) estas duas variedades apresentam respetivamente 10,7% e 5,6% genericamente duas das três percentagens mais altas de amido. Na O'Neal o comportamento foi inverso, enquanto que na Legacy, a tendência de aumento foi constante ao longo do tempo, à medida que se foi desenvolvendo fisiologicamente, parte aérea e fim de produção, foi aumentando a concentração de hidratos de carbono na raiz. A O'Neal comparativamente com a Legacy também foi desenvolvendo a sua parte aérea, no entanto visualmente a duas variedades são facilmente distintas (**Figura 24**).



Figura 24. Diferenças visuais entre as variedades O’Neal e Legacy. A- O’Neal; B- Legacy

Na 2ª data de colheita amostral as variedades Legacy e O’Neal apresentam as concentrações mais baixas de total de hidratos de carbono e as percentagens mais baixas de amido (**Quadro 10**), possivelmente devido a estas estarem no seu pico máximo de produção. Na 3ª data de colheita amostral, a Legacy e O’Neal apresentam as concentrações mais altas de total de hidratos de carbono, porém apresentam percentagens de amido mais baixas.

Quadro 15- Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação ao total de açúcares (mg/g de MS)

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita
Paloma	7,874 b	10,537 b	7,473 b
Legacy	4,481 b	6,044 b	8,796 b
O’Neal	25,926 a	6,594 b	10,595 b
Star	6,104 b	10,401 b	6,210 b

Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA.

9.2. Framboesas

No **Quadro 16** estão representados os resultados da quantificação dos teores de amido nas duas cultivares de framboesa em estudo, Kwanza e Kweli.

Quadro 16- Comparação dos teores de amido das diferentes variedades de framboesa e datas de colheita (mg/ 100mg de MS)

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita	4ªcolheita
	(27/4/16)	(23/5/16)	(30/6/16)	(16/12/16)
Kwanza	s/a	5,988 b	6,296 b	11,285 a
Kweli	s/a	0,773 c*	5,536 b	12,243 a

*Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA: s/a- Sem amostra suficiente para realizar este parâmetro: *Variedade de outro lote*

Na primeira colheita não foi possível analisar a percentagem de amido, uma vez que a MS das amostras era muito reduzida, visto que ambas as variedades ainda estavam no estado fenológico inicial (13). Na variedade Kweli, relativamente à segunda época de colheita, não era do mesmo lote das restantes, tornando os valores da variedade, discrepantes em relação aos da outra variedade.

Analisando o comportamento das duas cultivares, é possível verificar que os teores de amido não variam significativamente da 2ª para a 3ª colheita, mas o aumento é significativo para a 4ª data de amostragem. É notável a percentagem de amido por parte das duas variedades na quarta colheita, pois esta colheita coincide com o final da produção, estado fenológico (90). Nesta data ambas as plantas apresentam uma MS 100 vezes superior à inicial. Estes dois resultados confirmam o que já foi explicado por alguns autores, quando estes afirmam que quando a framboesa atinge área foliar suficiente (source) para suportar a sua principal sink, os frutos, não necessita de recorrer aos hidratos de carbono de reserva presentes nas raízes, uma vez que essa parte aérea vai suportar a sink principal, frutos, e ao mesmo tempo permitir que a planta comece a investir as suas reservas na parte radicular.

Relativamente ao **Quadro 17**, pode constatar-se que globalmente não existe diferenças significativas entre as variedades, sendo que entre as colheitas só existe diferenças significativas entre a 1ª colheita e a 3ª e 4ª data, sendo que nestas colheitas as plantas estavam a entrar no ciclo reprodutivo. A variedade Kweli destaca-se em relação a Kwanza por apresentar valores inferiores durante as quatro datas de colheitas. Os

valores mais baixos de sacarose da variedade Kweli podem ser resultado de um maior desenvolvimento da parte aérea, sendo o peso da sua MS sempre superior, comparativamente à variedade Kwanza. A planta possivelmente terá usado uma parte das suas reservas presentes nas raízes, para a produção de material vegetativo, nomeadamente os lançamentos, folhagem e consequente respiração (Koch, 2004).

Quadro 17. Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à Sacarose (mg/g de MS)

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita	4ªcolheita
Kwanza	4,624 c	6,450 bc	10,186 ab	13,723 a
Kweli	2,374 c	2,679 c*	10,081 ab	11,567 a

*Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA. *variedade de outro lote*

Como referido anteriormente nos mirtilos a sacarose é hidrolisada em glucose e frutose, de maneira a facilitar o seu transporte e utilização como energia no crescimento da planta.

Com esta ligação presente, será de todo o interesse analisar os **Quadros 17,18 e 19** em simultâneo.

Analisando quantitativamente o **Quadro 17**, a variedade Kwanza apresenta ao longo das diferentes datas concentrações de sacarose superiores. No **Quadro 18 e 19** a mesma variedade apresenta concentrações de frutose e glucose novamente superiores às concentrações da outra cultivar nas 1ª, 2ª, 3ª datas, porém na 4ª data, esta apresenta valores inferiores, talvez porque, a variedade Kwanza na 4ª data ainda está em fim de produção e a Kweli já terminou a sua produção, um parâmetro que poderá ser decisivo para este resultado, visto que esta ainda está a gastar hidratos de carbono.

Analisando estatisticamente, os teores de glucose, (**Quadro 19**) não apresentam diferenças significativas quer entre datas quer entre cultivares.

Referente à frutose, (**Quadro 18**) pode observar-se que existe diferenças significativas nos resultados obtidos na variedade Kwanza na segunda e terceira colheita em relação à primeira e terceira. Na variedade Kweli a terceira colheita é quantitativamente diferente as restantes.

Estes valores significativamente diferentes correspondentes na Kwanza à colheita dois e três podem ser explicados pelo maior desenvolvimento das plantas nestas duas colheitas, a sacarose é hidrolisada daí resultando a frutose e glucose, dois açúcares associados ao crescimento das plantas.

Nas framboesas, a proporção de 1:1 destes dois hidratos de carbono não se verificou.

Quadro 18. Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à Frutose (mg/g de MS)

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita	4ªcolheita
Kwanza	1,000 bc	4,725 a	4,543 a	0,424 c
Kweli	1,014 bc	1,460 bc*	3,325 ab	0,821 bc

*Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA. *variedades de outro lote*

Quadro 19. Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à Glucose (mg/g de MS).

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita	4ªcolheita
Kwanza	2,889 a	3,177 a	2,905 a	1,241 a
Kweli	2,401 a	1,400 a*	2,088 a	1,883 a

*Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA. *variedades de outro lote*

Analisando o **Quadro 20**, pode verificar-se que globalmente não existe diferenças significativas referentes à rafinose, entre as variedades nas respetivas datas de colheita. Porém existe diferenças significativas entre as duas primeiras datas relativamente as duas últimas datas, podendo observar-se que nas últimas duas colheitas os valores são tendencialmente mais elevados em relação aos dois primeiros valores.

Quadro 20. - Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação à Rafinose (mg/g de MS).

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita	4ªcolheita
Kwanza	0,836 bcd	0,769 cd	1,889 abc	2,824 a
Kweli	0,864 bcd	0,094 d*	2,133 ab	1,996 abc

*Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA.*variedades de outro lote*

Estes valores das duas datas podem ser explicados devido à rafinose ser considerado um açúcar de reserva e neste momento de colheita as plantas já estarem a investir na acumulação dos mesmos na parte radicular (sink).

Relativamente à soma total dos açúcares (**Quadro 21**) pode verificar-se, que não existe diferenças significativas entre variedades, porém existe diferenças significativas entre épocas de colheita. A nível quantitativo e estatístico destaca-se a variedade Kweli na 2ªdata, algo já explicado anteriormente.

As primeiras duas colheitas são significativamente diferentes das duas últimas colheitas, esta diferença pode ser associada a um maior uso de hidratos de carbono de reserva por parte das duas variedades nas primeiras datas. Na altura das primeiras colheitas não existia parte aérea suficiente para suportar as necessidades das plantas e esta necessitou de recorrer às reservas carbonadas presentes nas raízes, o que já não se vem a observar nas duas últimas colheitas, visto que os valores observados comparativamente aos primeiros são mais elevados.

A variedade Kweli apresenta nas quatro datas valores inferiores comparativamente à Kwanza, esta observação pode ser apoiada pelo maior peso de MS e como foi referido anteriormente a Kweli é uma variedade mais produtiva (15 t/ha) do que a Kwanza (10 t/ha), tendo mais gastos de hidratos de carbono do que a Kwanza.

Quadro 21. Comparação entre a interação de Variedades e datas de colheita em relação aos açúcares totais (mg/g de MS).

Variedades	1ªcolheita	2ªcolheita	3ªcolheita	4ªcolheita
Kwanza	9,350 cd	11,122bcd	19,525 a	18,214 ab
Kweli	6,655 d	5,636 d*	17,628 ab	16,268 ab

*Nota: Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha=0,05$, letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes, p-value da ANOVA. *variedades de outro lote*

10. Evolução do amido e dos açúcares de baixo peso molecular nas diferentes cultivares ao longo das diferentes datas de colheitas de amostras

10.1. Mirtilos

Apresenta-se de seguida uma análise gráfica de evolução do amido e açúcares de baixo peso molecular (sacarose, frutose, glucose e rafinose) nas diferentes variedades de mirtilo.

Pode observar-se (**Figura 25**) que a variedade Paloma, na 1ªdata relativamente as outras variedades, apresenta uma menor percentagem de amido, cerca de 8%, algo explicável pelo seu adiantado desenvolvimento fenológico, sendo mesmo a primeira variedade a entrar em produção. A variedade O'Neal nesta mesma data possui a maior percentagem de amido, cerca de 43%, algo que é explicado por esta variedade estar algo atrasada fenologicamente.

A variedade Legacy, tendo um carácter intermédio a nível de horas de frio, sendo considerada por muitos autores como uma variedade intermédia, entra mais tardiamente em produção. Comparativamente com a O'Neal possui menos amido, algo que poderá ser controverso, visto que ambas entram mais tardiamente em produção e uma possui cerca de 43% de amido e a outra cerca de 18%. Diferenças em termos genéticos poderão estar relacionadas com este facto. Visto que a cultivar Legacy entra mais tardiamente em produção e é a cultivar com maior produção, a percentagem de amido na terceira colheita é algo surpreendente, visto que o seu tempo de recuperação de amido é menor que a da variedade Paloma por exemplo, que inicia o seu ciclo

primeiro e tem mais tempo para recuperar as reservas. Este comportamento fisiológico por parte da Legacy pode estar relacionado com o estudo citado por (Oliveira et al., 2012), em relação à variedade Power Blue, em que a cultivar pode estar melhor adaptada ao clima, ser mais resistente às doenças, planta muito produtiva e vigorosa, possibilitando maior armazenamento de reservas amiláceas para enfrentar o período de dormência.

A 3ª data é a que possui maior percentagem de amido, coincide com o final de produção de todas as variedades e com o cessar de crescimentos vegetativos por partes das plantas de mirtilo. Nesta altura já não existe a competição entre as sinks (fruto e raiz) e as sources exportam os fotoassimilados para o seu órgão de reserva em estudo, a raiz.

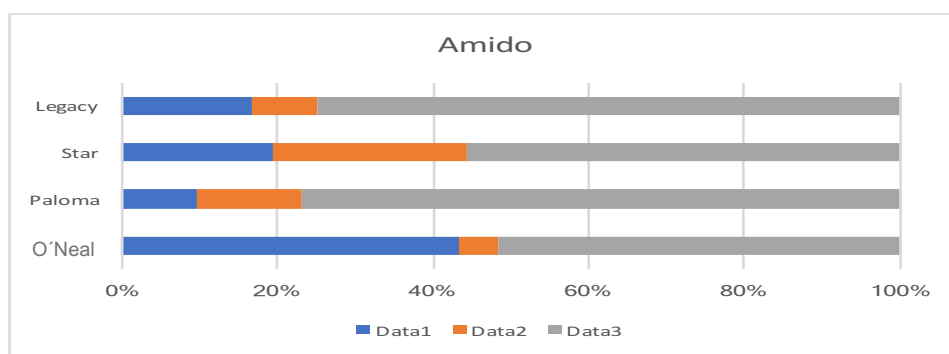


Figura 25- Percentagem de amido nas variedades de mirtilo ao longo das três datas de colheita.

Analisando as **Figuras** seguintes **26**, **27**, **28** e **29**, representativas da evolução dos açúcares ao longo do tempo, pode observar-se que a sacarose é o hidrato de carbono mais abundante em todas as variedades e ao longo do tempo, atingindo valores médios de 65 % em cada data de colheita. A variedade O'Neal apresenta o valor mais elevado de sacarose (71%) na primeira colheita, o que poderá estar relacionado com o menor desenvolvimento desta variedade em relação às restantes variedades, tanto a nível vegetativo como reprodutivo, sendo esta percentagem de sacarose elevado visto que ainda não foi utilizada. Nas três datas, a frutose e glucose mantêm-se equiparadas dentro de cada variedade, atingindo percentagens de cerca de 17%, e diminuindo para cerca de 9% na última colheita. Os valores destes dois hidratos de carbono são mais elevados na primeira e segunda colheita, devido ao maior crescimento da planta tanto a nível vegetativo, novos lançamentos e folhas, quer a nível de produção de fruto. A diminuição na terceira data relaciona-se com a paragem da produção e desenvolvimento vegetativo, de modo a permitir o armazenamento de reservas para o próximo ciclo.

O oligossacárido rafinose, na primeira data de amostragem, possui percentagens baixas em todas as variedades, aproximadamente 4% na média geral das variedades; na segunda colheita, existe algum aumento dessa percentagem atingindo mesmo 10% na variedade O'Neal, porém nas outras variedades aumenta só ligeiramente e na variedade Star mantém-se mesmo constante. Na terceira colheita, este oligossacárido atinge o seu máximo de 20% (em média nas variedades), este aumento é previsível pois, juntamente com a sacarose e amido, este açúcar pode ter um papel de reserva nas plantas, a par de um papel estratégico no suporte de baixas temperaturas por parte das plantas.

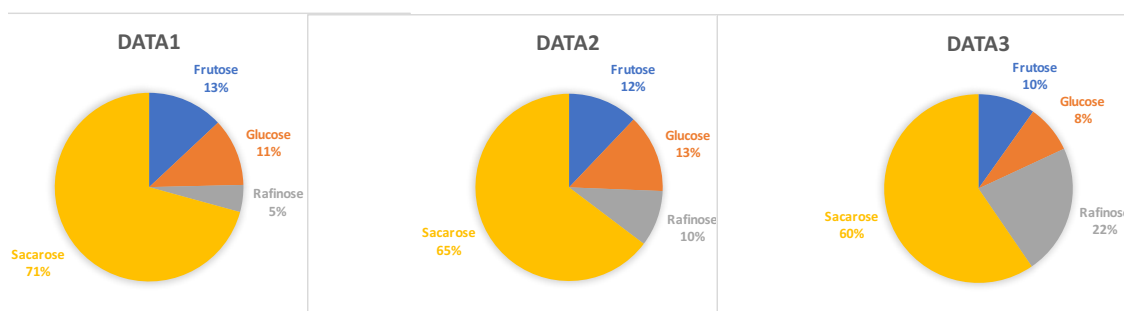


Figura 26- Evolução dos açúcares na variedade O'Neal ao longo das três datas de colheita.

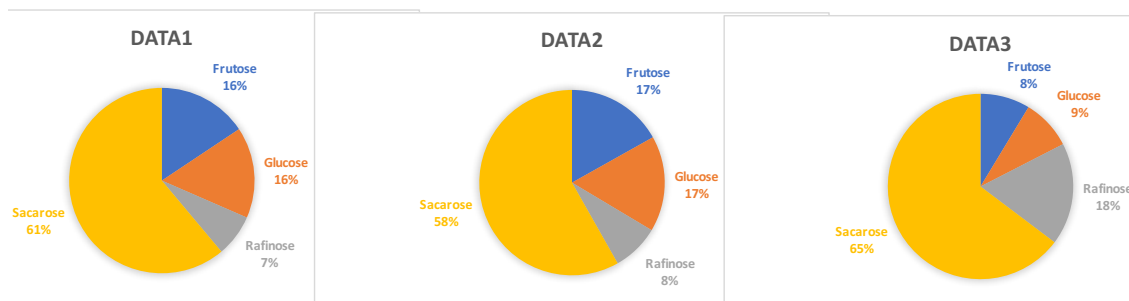


Figura 27- Evolução dos açúcares na variedade Paloma ao longo das três datas de colheita.

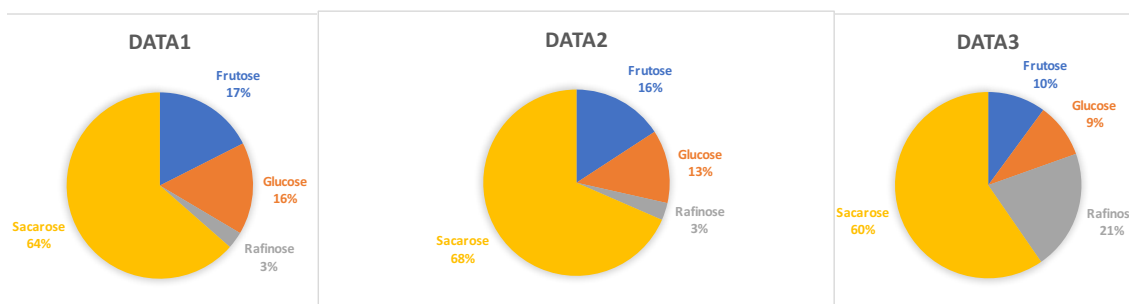


Figura 28- Evolução dos açúcares na variedade Star ao longo das três datas de colheita.

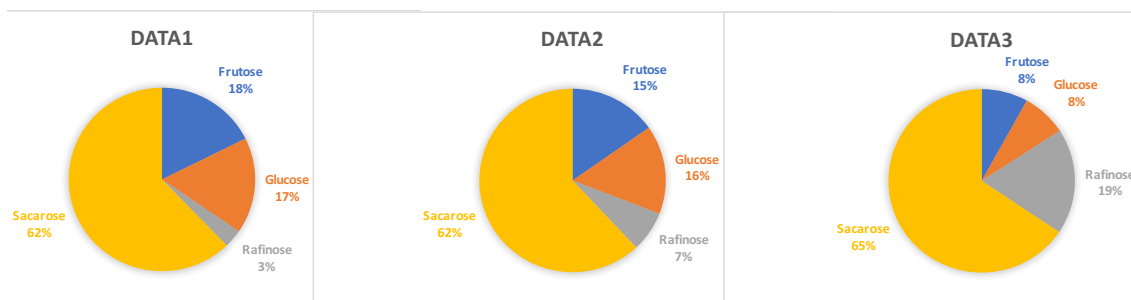


Figura 29- Evolução dos açúcares na variedade Legacy ao longo das três datas de colheita.

As ilações que se podem tirar da **Figura 30** são, respetivas ao comportamento das quatro variedades em relação ao total de açúcares nos diferentes estádios de colheita das raízes. Pode observar-se que as variedades Paloma e Star comportam-se como plantas autorreguladoras, isto é, conseguem controlar os seus gastos de hidratos de carbono, na primeira colheita e na última colheita apresentam valores próximos/semelhantes.

A variedade Legacy apresenta valores crescentes, o que leva a demarcá-la como uma planta eficiente, isto é, acumula mais energia do que aquela que gasta, visto que com o decorrer do ciclo, a sua produção de fruto e desenvolvimento, não põe em causa o seu armazenamento de reservas na raiz.

A variedade O'Neal ao longo do seu ciclo comporta-se como uma planta 'suicida' isto é, apresenta valores surpreendentes na primeira colheita de amostra, mas com a sua entrada em produção ela gasta uma enorme parte das suas reservas, não conseguindo manter as suas reservas constantes.

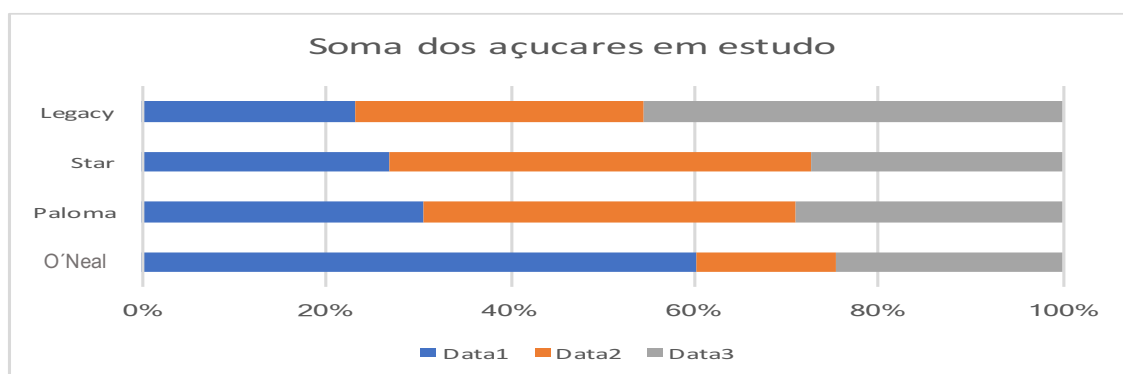


Figura 30- Evolução dos açúcares nas raízes ao longo do tempo nas quatro variedades de mirtilo.

10.2. Framboesa

Fez-se para a framboesa uma análise análoga à que foi apresentada para os mirtilos.

Analisando a **Figura 31**, referente à proporção relativa de amido, o valor que se volta a destacar é o valor da variedade Kweli na 2ª data, valor muito baixo, menos de 5%, comparativamente ao da Kwanza na 2ª data, 23%. A colheita de amostra referente à 4ª data, é a que apresenta proporções relativas superiores de amido, algo que poderia ser contraditório uma vez que nesta data as plantas estavam no final da produção, e supostamente os fotoassimilados destinavam-se aos frutos. No entanto, estudos anteriormente realizados mostram que quando as framboesas adquirem parte vegetativa suficiente para suportar o próprio crescimento vegetativo e reprodutivo, os fotoassimilados começam a ser translocados para a raiz, de maneira que as reservas da planta sejam repostas.

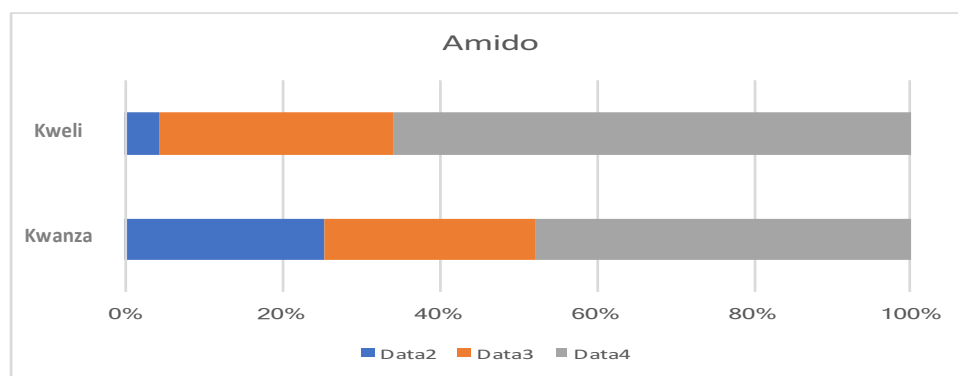


Figura 31- Proporção relativa de amido nas variedades de framboesa ao longo das três datas de colheita.

Observando-se as **Figuras 32 e 33** referentes à evolução dos açúcares nas variedades Kwanza e Kweli, pode observar-se que a sacarose é o hidrato de carbono mais abundante entre estas duas variedades de framboesa, à semelhança do que aconteceu com o mirtilo, apresentando a sua maior percentagem de sacarose na terceira e quarta colheita de amostras, correspondente ao final do crescimento vegetativo e final de produção. Nestas datas, as plantas já possuem parte aérea suficiente para suportar as exigências da sink principal, fruto, nessa mesma altura os fotoassimilados também começam a ser remobilizados no principal órgão de reserva da framboesa, a raiz.

Nestas variedades, a percentagem de glucose e frutose não se encontra na proporção de 1:1, algo evidente na primeira colheita em que estes dois hidratos de carbono surgem com percentagens de 36% e 15% na variedade Kweli.

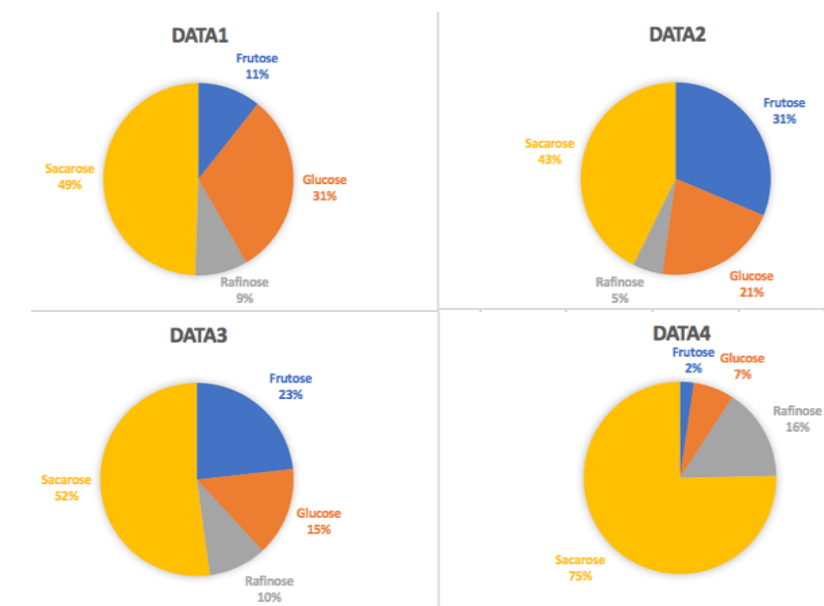


Figura 32- Evolução dos açúcares de baixo peso molecular na variedade Kwanza ao longo das quatro datas de colheita.

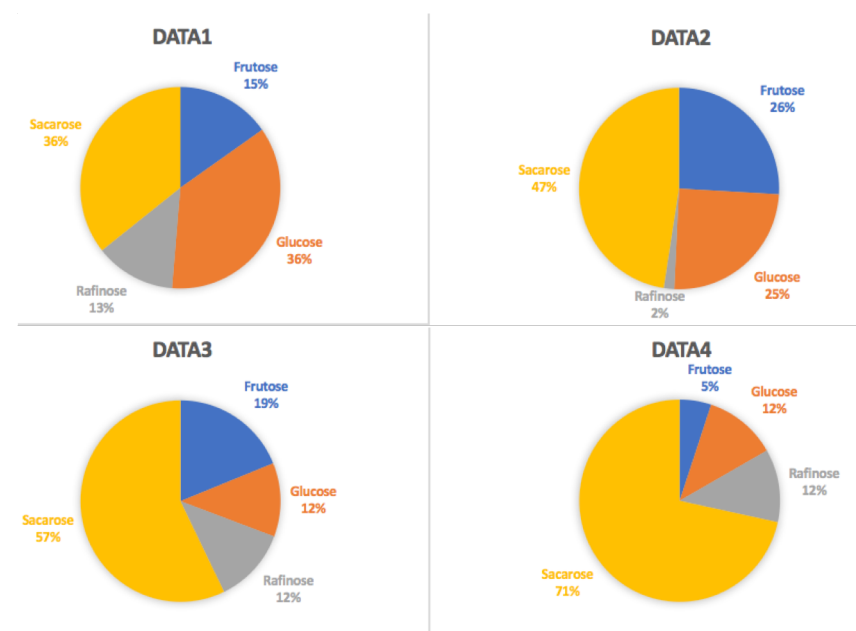


Figura 33- Evolução dos açúcares de baixo peso molecular na variedade Kweli ao longo das quatro datas de colheita.

Porém, nestas variedades, estes dois açúcares surgem com uma elevada percentagem em comparação com os outros açúcares, este acontecimento possivelmente pode surgir pelo rápido desenvolvimento da planta, uma vez que na 1ª data a Kweli tinha um peso

de MS da parte aérea de 4,14 g e na 3ª data de 413,5 g, demonstrando um elevado desenvolvimento da planta.

A rafinose na 1ª data de colheita surge com uma percentagem maior do que na 2ª data de colheita, algo que pode ser explicado pela obtenção das plantas; ambas provêm de gomos da raiz, com o desenvolvimento das mesmas essa percentagem relativa diminui, devido a planta utilizar essa reserva para o seu desenvolvimento. Com o decorrer do ciclo da planta, a percentagem de rafinose volta a aumentar alcançando 16% na quarta colheita por parte da variedade Kwanza. Como já foi mencionado anteriormente este hidrato de carbono pode funcionar como hidrato de carbono de reserva, o que se pode explicar o seu aumento na 3ª e 4ª data.

Apresenta-se na **Figura 34** à semelhança da comparação entre estas duas variedades de framboesa, uma avaliação em relação a soma dos açúcares em estudo. A única data que se destaca é a 2ª data referente à variedade Kweli, algo que já foi explicado anteriormente, a variedade nesta data possuía ínfimas reservas, devido a esta se encontrar em condições diferentes das outras.

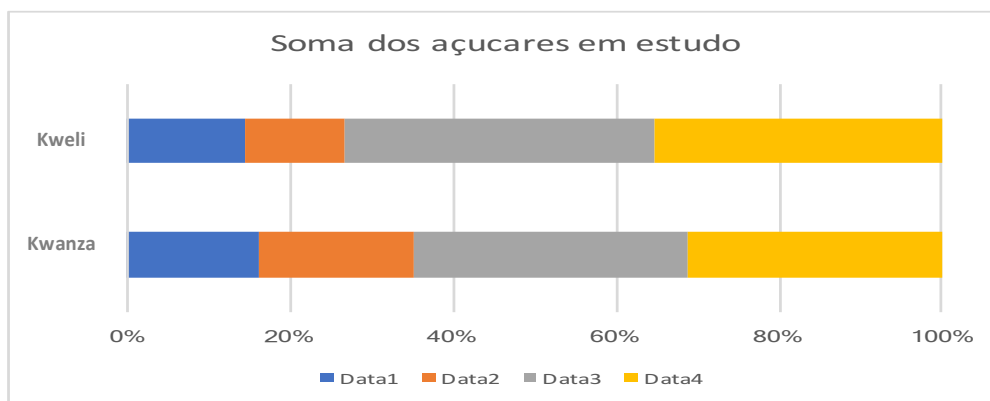


Figura 34- Soma dos açúcares em estudo nas variedades Kweli e Kwanza durante as épocas de recolha de amostras.

Na 1ª data existe a menor proporção relativa de açúcares de baixo peso molecular, devido ao início do desenvolvimento vegetativo, cerca de 18%. A 2ª data corresponde ao meio do crescimento vegetativo e corresponde a uma percentagem média de 20% de açúcares, a 3ª data corresponde ao final do ciclo vegetativo e início do ciclo reprodutivo, correspondendo a cerca 28%, e a última data de colheitas de raízes corresponde ao final de produção por parte das duas variedades e a aproximadamente 25%. Observa-se assim à medida que decorre o desenvolvimento da planta, as raízes vão armazenar hidratos de carbono já a “pensar” no novo ciclo da planta.

11. Discussão geral e conclusão

O objetivo do presente trabalho é a identificação e quantificação dos principais hidratos de carbono solúveis e do amido, presentes nas raízes de mirtilo e framboesa, para reunir informação que posteriormente permita proporcionar uma melhor adaptação destas variedades a nível geográfico, e fundamentar as opções fitotécnicas com base numa modelação fisiológica. A este nível, a informação recolhida poderá suportar decisões no âmbito da diminuição da área foliar, arquitetura da planta, tipo de poda e monda de frutos, processos que influenciam a concentração de hidratos de carbono por parte da planta. Este estudo pode contribuir positivamente para uma melhor gestão de rendimento por parte da planta, sem que se coloque em causa as suas reservas carbonadas.

Conhecendo os diferentes hidratos de carbono e as suas concentrações durante o ciclo vegetativo e reprodutivo, é possível conhecer melhor as necessidades da cultura e respetivas variedades em termos agronómicos, podendo tratá-las de maneira distinta. Para além disso, a quantificação das respostas fotossintéticas, os padrões de translocação do carbono e as relações *sink-source* contribuem para a compreensão do crescimento da planta e o seu posterior potencial produtivo, o que é bastante importante, visto que estas duas culturas têm um enorme potencial de valor (fruto).

Este trabalho revelou preliminarmente a presença de sacarose, glucose, frutose e rafinose nas raízes de mirtilo e framboesa.

Palonen (1999b), num estudo semelhante identificou e quantificou sacarose, glucose, frutose e traços de rafinose na casca do caule de framboesa durante a estação de crescimento. Em mirtilo, Kaur et al., (2012) identificaram e quantificaram sacarose, frutose e glucose no caule, não existindo estudos de identificação individualizada e quantificação de açúcares nas raízes.

Estes autores referem que poderia ser encontrado manitol, em partes estruturais no mirtilo, porém neste estudo não foi identificado, visto não existir picos com o tempo de retenção 8,8 minutos. Da mesma forma, (Palonen, 1999b) identificou a presença de estaquiose nos lançamentos da framboesa, contudo neste presente trabalho também não houve identificação deste hidrato de carbono, uma vez que o seu tempo de retenção era aos 36 minutos, não existindo nenhum pico na amostra com este tempo de retenção.

Segundo Wallaart (1980), as plantas de framboesa, como outras espécies de *Rubus L.*, não contêm sorbitol, uma característica útil na classificação intrafamiliar de *Rosaceae*.

Esta característica foi confirmada neste estudo, uma vez que não existiu identificação de sorbitol nas raízes de framboesas.

A sacarose revelou-se o hidrato de carbono mais abundante em todas as variedades de mirtilo, destacando-se a variedade O'Neal com 71% na primeira data de amostragem. A glucose e frutose tem um carácter não muito oscilante entre datas e variedades. A rafinose reforça o papel de ser um açúcar de reserva e de protetor contra baixas temperaturas, visto que vai atingindo o seu máximo com o desenvolver do ciclo e diminuição de temperatura.

Relativamente ao estudo do amido pode realçar-se um acontecimento peculiar entre as variedades O'Neal e Legacy: ambas apresentam uma evolução fenológica idêntica durante o ciclo vegetativo, contudo as percentagens de amido são díspares, a O'Neal apresenta 43% e a Legacy 18% na primeira data de amostragem. Estas diferenças podem resultar de diferença genética, e do seu carácter produtivo.

Em relação às variedades de framboesa, pode concluir-se que novamente a sacarose é o principal hidrato de carbono nas duas variedades, à semelhança do que aconteceu com o mirtilo. A glucose e a frutose nas framboesas têm um carácter mais oscilante, possivelmente associado a um crescimento acentuado das plantas; a título de exemplo, a Kweli na primeira data de amostragem possui um peso médio de 4,14 g de MS da parte aérea e na última data tem um peso médio de MS da parte aérea de 413,5 g.

A rafinose mantém o mesmo registo de hidrato de carbono de reserva, como observado nas plantas de mirtilo. Com o desenvolvimento do ciclo fisiológico, a sua percentagem vai aumentando, alcançando mesmo 16% na quarta data de amostragem na Kwanza.

No estudo do amido, a framboesa volta a comprovar que, quando esta atinge área foliar suficiente para apoiar o crescimento dos frutos, esta vai voltar também a reabastecer a raiz com açúcares. Assim, na quarta data, coincidente com o final de produção, a Kwanza apresenta aproximadamente 50% de amido, comparativamente com as outras datas de amostragem.

Os resultados obtidos anteriormente ainda são preliminares e propícios a serem melhorados. As técnicas de identificação e quantificação foram adaptadas de modo a obter o máximo rendimento, porém ainda existem falhas, não no método adaptado em si, mas devido à amostra ser muito reduzida. Desta forma, futuramente deverá ser tido

em conta a utilização de uma amostragem maior (maior número de plantas) e maior quantidade de material (maior peso de matéria seca). Isto permitirá não só um maior número de dados, mas também mais informação sobre os hidratos de carbono e respectivas concentrações/translocações ao longo do tempo e crescimento das plantas, assim como possibilidade de uma identificação mais detalhada e rigorosa. Para além disso, o estudo das duas culturas em simultâneo foi dificultado devido ao seu crescimento se realizar em contra-ciclos fisiológicos, propiciando unicamente a comparação qualitativa de hidratos de carbono e não quantitativa.

Futuramente, seria interessante a continuação deste trabalho, talvez não com as duas culturas em simultâneo, mas sim em separado, de maneira a obter uma informação mais detalhada acerca de cada uma das culturas, visto que os hidratos de carbono variam bastante tanto a nível sazonal como fisiológico. Esta informação permitirá melhorar as práticas fitotécnicas das culturas para maximizar o seu rendimento.

12. Bibliografia

- Abbott, J., & Gough, R.** (1987). Seasonal development of highbush blueberry roots under sawdust mulch. *Journal of the American Society for Horticultural*, 112(1), 60–62.
- Ahmad, T., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A., & Ali, A.** (2007). Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock gf-677. *Pak. J. Bot*, 39(4), 1269–1275.
- Alves, G., Decourteix, M., Fleurat-Lessard, P., Sakr, S., Bonhomme, M., Ameglio, T., ... Guilliot, A.** (2007). Spatial activity and expression of plasma membrane H⁺-ATPase in stem xylem of walnut during dormancy and growth resumption. *Tree Physiology*, 27(10), 1471–1480.
- Baker, R., & Butterfield, H.** (1951). Commercial Bushberry Growing in California. RE Baker. HM Butterfield.
- Ballington, J. R.** (1990). “O’Neal’ southern highbush blueberry. *HortScience*, 25(6), 711–712.
- Banco de imagens framboesa e mirtilo.** (2017) Retrieved February 15, 2017, from <https://www.canstockphoto.com.br/branca-framboesa-isolado-maduro-41242652.html>
- Barney, D., Byther, R., Bristow, P., Cogger, C., Fitzpatrick, S., Hart, J. M., ... Rempel, H.** (2007). Commercial Red Raspberry Production in the Pacific Northwest (Teresa Wel, pp. 59–61). Oregon, Idaho, Washington: Pacific Northwest Extension publication PNW 598.
- Bennion, M.** (1980). *Science of food. Science of food*. New York: Harper & Row Ltd.
- Birkhold, K. T., Koch, K. E., & Darnell, R. L.** (1992). Carbon and Nitrogen Economy of Developing Rabbiteye Blueberry Fruit. *Journal American Society for Horticultural Science.*, 117(1), 139–145.
- Bonhomme, M., Rageau, R., Lacoïnte, A., & Gendraud, M.** (2005). Influences of cold deprivation during dormancy on carbohydrate contents of vegetative and floral primordia and nearby structures of peach buds (*Prunus persica* L. Batch). *Scientia Horticulturae*, 105(2), 223–240.
- Braun, J. W., Garth, J. K. L., & Brun, C. A.** (1989). Distribution of foliage and fruit in association with light microclimate in the red raspberry canopy. *Journal of Horticultural Science*, 64(5), 565–572.
- Brierley, W., & Landon, R.** (1936). Some evidence relating to the downward movement of photosynthate in fruiting canes of the red raspberry. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci*, 34, 377–380.
- Bruni, F., & Leopolo, A. C.** (1992). Pools of water in anhydrobiotic organisms. *Biophysical Journal*, 63(3), 663–672.
- Bryla, D.** (2011). Crop evapotranspiration and irrigation scheduling in blueberry. *Measurements to Agricultural and Environmental Applications*, 167–186.
- Buskienė, L., & Uselis, N.** (2008). The influence of nitrogen and potassium fertilizers on the growth and yield of raspberries cv. “Polana.” *Agronomy Research*, 6(1), 27–35.
- Camp, W.** (1945). The North American blueberries with notes on other groups of Vacciniaceae. *Brittonia*, 5(3), 203–275.
- Carew, J. G., Gillespie, T., White, J., Wainwright, H., Brennan, R., & Battey, N. H.** (2000). The control of the annual growth cycle in raspberry. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(5), 495–503.
- Carrapiço, F.** (2002). Transformações Energéticas nos Vegetais, 1–8.
- Childers, N. F., & Lyrene, P. M.** (2006). *Blueberries for growers, gardeners, and promoters*. Norman F. Childers Horticultural Publications.
- Consulai.** (2014). O mercado dos pequenos frutos.
- Costa, R.** (2014). *Nutrição Mineral em Plantas Vasculares*. Évora.

- Crandall, P.** (1995). Bramble production. The management and marketing of raspberries and blackberries. *Bramble Production. The Management and Marketing of Raspberries and Blackberries*.
- Crandall, P., Allmendinger, D., Chamberlain J, & Biderbost, K.** (1974). Influence of cane number and diameter, irrigation, and carbohydrate reserves on the fruit number of red raspberry. *Journal American Society for Horticultural Science*, 99(6), 524–526.
- Dale, A., & Janick, J.** (2011). Productivity in Red Raspberries. In *Horticultural Reviews* (pp. 185–228). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Dalman, P.** (1989). Within-plant competition and carbohydrate economy in the red raspberry. *Acta Horticulturae*, (262), 269–276.
- DaMatta, F. .** (2007). Ecophysiology of tropical tree crops: an introduction. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19, 239–244.
- Darnell.** (1991). Photoperiod, Carbon Partitioning, and Reproductive Development in Rabbiteye Blueberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(5), 856–860.
- Darnell.** (2006). Blueberry botany/environmental physiology. *Blueberries. Horticultural Publications, Florida, USA*, 5–13.
- Darnell, R. L., & Birkhold, K. B.** (1996). Carbohydrate Contribution to Fruit Development in Two Phenologically Distinct Rabbiteye Blueberry Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(6), 1132–1136.
- Darrow.** (1958). Seed number in blueberry fruit. *Proceedings of the American Society for the Horticultural Science*, (72), 212–214.
- Demchak, K.** (2013). The Mid-Atlantic Berry Guide: for Commercial Growers. *The Pennsylvania State University*, 115–170.
- Domínguez, F.** (2007). *El cultivo del frambueso en Huelva*. Cornellá, Barcelona.
- Eck, P.** (1988). *Blueberry science*. Blueberry science. USA: Rutgers University Press.
- Esteves, A., Valdivieso, T., & Oliveira, P.** Estudo da diferenciação floral em framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.), 18Actas Portuguesas de Horticultura 320–324 (2011).
- Fatores que influenciam a fotossíntese. (2017). Retrieved March 27, 2017, from <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/bioquimica/bioquimica17.php>
- Fernandez, G., & Pritts, M.** (1994). Growth, carbon acquisition, and source–sink relationships in “Titan” red raspberry. *Amer. Soc. Hort. Sci.*, (119), 1163–1168.
- Fernandez, & Pritts, M. P.** (1993). Growth and source-sink relationships in “titan” red raspberry. *Acta Horticulturae*, (352), 151–158.
- Flore, J. A., & Layne, D. R.** (1999). Photoassimilate Production and Distribution in Cherry. *Hortscience*, 34(6), 10–16.
- Fonseca, L., & Oliveira, P.** (2007a). A planta de mirtilo: Morfologia e fisiologia. *Divulgação Agro*, 556(2), 1–26.
- Fonseca, L., & Oliveira, P.** (2014). Algumas considerações sobre a plantação de mirtilos | Portal Agronegócios.eu. Retrieved March 27, 2017, from <http://www.agronegocios.eu/noticias/algumas-consideracoes-sobre-a-plantacao-de-mirtilos/>
- Food and Agricultura Organization of the United Nations.** (2014). FAOSTAT. Retrieved May 15, 2017, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Food and Agricultura Organization of the United Nations.** (2014). FAOSTAT. Retrieved May 15, 2017, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Funt, R. C., & Hall, H. K. (Harvey K. .** (2013). Raspberries. In *Growth and development* (pp. 21–32). CABI.
- Gill, R.** (2015). Chemical fundamentals of geology and environmental geoscience, 160–175.
- Godt, D. E., & Roitsch, T.** (1997). Regulation and Tissue-Specific Distribution of mRNAs for Three Extracellular Invertase Isoenzymes of Tomato Suggests an Important Function in Establishing and Maintaining Sink Metabolism. *Plant Physiology*,

- 115(1), 273–282.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J., & Hinch, D. K.** (2008). Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 132(0), 220–235.
- Hall, H., & Sobey, T.** (2013). Climatic Requirements. In *Raspberries* (pp. 33–44). UK: CAB International.
- Handley, D.** (2011). Growing Highbush Blueberries. *University of Maine Cooperative Extension*.
- Hansen, P., & Grauslund, J.** (1973). 14C-Studies on Apple Trees. VIII. The Seasonal Variation and Nature of Reserves. *Physiologia Plantarum*, 28(1), 24–32.
- Hartmann's Plant Company.** (2004). Paloma™/Haven.
- Heide, O. M., & Sonstebj, A.** (2011). Physiology of flowering and dormancy regulation in annual- and biennial-fruiting red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(5), 433–442.
- Heidenreich, C., Pritts, M., Demchak, K., & Hanson, E.** (2012). High Tunnel Raspberries and Blackberries. Cornell University Department of Horticulture. Ithaca, NY, 17(3), 13–16.
- Herold, A.** (1984). Biochemistry and physiology of synthesis of starch in leaves: autotrophic and heterotrophic chloroplasts. *Storage Carbohydrates in Vascular Plants*, 181–205.
- Hudson, J. P.** (1959). Effects of Environment on *Rubus idaeus* L.: I. Morphology and Development of the Raspberry Plant. *Journal of Horticultural Science*, 34(3), 163–169.
- INE, & GPP.** (2017). *Estatísticas agrícolas 2016*.
- Ipma - Instituto Português do Mar e da Atmosfera.** (2016). IPMA. Retrieved from <https://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/>
- Ireland, G., & Wilk, P.** (2006). Blueberry production in northern NSW. *New South Wales Dept. Primary Ind., Primefact*, 1–8.
- Irving, D., Hurst, P., & Ragg, J.** (1997). Changes in carbohydrates and carbohydrate metabolizing enzymes during the development, maturation, and ripening of buttercup squash (*Cucurbita maxima* D. Delica). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(3), 310–314.
- Jennings.** (1975). Some physiological changes occurring in overwintering raspberry plants in Scotland. *Horticultural Research*, 14, 103–108.
- Jennings, D. L.** (1988). Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth. *Raspberries and Blackberries: Their Breeding, Diseases and Growth*.
- Jia, H.-J., Araki, A., & Okamoto, G.** (2005). Influence of fruit bagging on aroma volatiles and skin coloration of “Hakuho” peach (*Prunus persica* Batsch). *Postharvest Biology and Technology*, 35(1), 61–68.
- Karin, S., Heinrich, H., Benno, G., & Hansueli, H.** (2001). Phänologische Entwicklungsstadien der Himbeere (*Rubus idaeus* L.). *AGRAR Forschung*, 8(5), 215–222.
- Kaur, J., Percival, D., Hainstock, L. J., & Privé, J.-P.** (2012). Seasonal growth dynamics and carbon allocation of the wild blueberry plant (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Canadian Journal of Plant Science*, 92(6), 1145–1154. <https://doi.org/10.1139/CJPS2011-204>
- Kaurin, A., Junttila, O., & Hanson, J.** (1981). Seasonal changes in frost hardiness in cloudberry (*Rubus chamaemorus*) in relation to carbohydrate content with special reference to sucrose. *Physiologia Plantarum*, 52(2), 310–314.
- Keep, E.** (1988). Primocane (autumn)-fruiting raspberries: a review with particular reference to progress in breeding. *Journal of Horticultural Science*, 63(1), 1–18.
- Kershaw, C. E.** (1991). The effect of temperature on the rate of shoot development in the raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivar “Autumn Bliss.” *Doctoral Dissertation, Imperial College London, University of London*.
- Koch, K.** (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235–246.

- Krewer, G., & Nesmith, D. S.** (2006). Blueberry Cultivars for Georgia.
- Kwanza®** - Abbreeding. (2013). Retrieved April 6, 2017, from <https://www.abbreeding.nl/varieties/kwanza/?lang=en>
- Kweli®** - Abbreeding. (2013). Retrieved March 6, 2017, from <https://www.abbreeding.nl/varieties/kweli/?lang=en>
- Lewis, D.H.** (1984). Occurrence and distribution of storage carbohydrates in vascular plants. *Seminar Series-Society for Experimental Biology*, 1–53.
- Lindhorst, T.** (2000). *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry* (First Edit). New York: Wiley-VCH. Retrieved from <http://scholle.oc.uni-kiel.de/lind/GlycoQuizz.pdf>
- Loescher, W., McCamant, T., & Keller, J.** (1990). Carbohydrate reserves, translocation, and storage in woody plant roots. *HortScience*, 25(3), 274–281.
- Lourenço, M. C.** (2014). Análise de hidratos de carbono não estruturais em oliveira cv. Cobrançosa, 11–20.
- Lyrene, P. M., & Sherman, W. B.** (2000). “Star” Southern Highbush Blueberry. *Hortscience*, 35, 950–957.
- Lyrene, P., & Williamson, J.** (2006). Protecting blueberries from freezes. Childers, NF; Lyrene, PM *Blueberries for Growers, Gardeners and Promoters*. Gainesville, Florida: Dr. Norman F. Childers, 21–25.
- Madeira, B.** (2016). *Cultura do Mirtilo*. (Publindústria, Ed.) (1st ed.).
- Matos, S.** (2015). *Influência da localização geográfica de produção nas propriedades de mirtilos' Vaccinium Corymbosum L.'cv Bluecrop*.
- Maust, B. E., Williamson, J. G., & Darnell, R. L.** (1999). Flower Bud Density Affects Vegetative and Fruit Development in Field-grown Southern Highbush Blueberry. *HortScience*, 34(4), 607–610.
- Maust, B. E., Williamson, J. G., & Darnell, R. L.** (2000). Carbohydrate Reserve Concentrations and Flower Bud Density Effects on Vegetative and Reproductive Development in Southern Highbush Blueberry. *Journal American Society for Horticultural Science*, 125(4), 413–419.
- meteoblue.** (2016). Arquivo meteorológico Odemira - meteoblue. Retrieved March 15, 2017, from https://www.meteoblue.com/pt/tempo/previsao/archive/odemira_portugal_226547_2?fcstlength=1y&year=2016&month=10
- Meyer, H. J., & Prinsloo, N.** (2003). Assessment of the Potential of Blueberry Production in South Africa. *Small Fruits Review*, 2(3), 3–22.
- Moon, J. W. J., Hancock, J. F. J., Draper, A. D., & Flore, J. A.** (1987). Genotypic differences in the effect of temperature on CO₂ assimilation and water use efficiency in blueberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science (USA)*, 112, 170–173.
- Neto, C.** (1997). *Evolução dos Hidratos de Carbono e proteína solúvel em framboesas remontantes em cultura protegida*. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Odemira Município.** (2016). Estratégia municipal de adaptação às alterações climáticas, 1–35.
- Oliveira.** (1994). *Influência da data de poda na produtividade da framboesa remontante em estufa*. Instituto Superior de Agronomia.
- Oliveira, C., & Priestley, C.** (1988). *Carbohydrate reserves in deciduous fruit trees*. *Horticultural Reviews*, Volume 10 (Vol. 10). Horticultural Reviews.
- Oliveira, P., Fonseca, L., & Silva, A. R.** (2007a). Framboesa Tecnologias de produção.
- Oliveira, P., Silva, M. J., Ferreira, R. B., Oliveira, C. M., & Monteiro, A. A.** (2007). Dry Matter Partitioning, Carbohydrate Composition, Protein Reserves, and Fruiting in Autumn Bliss Red Raspberry Vary in Response to Pruning Date and Cane Density. *Hortscience*, 42(1), 77–82.
- Oliveira, R., Bianchi, V., Aires, R., & Campos, Â.** (2012). Teores de carboidratos em estacas lenhosas de mirtilheiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(4), 1199–1207.

- Oliveira, Valdivieso, T., Esteves, A., Mota, M., & Fonseca, L.** (2007). *A planta de framboesa Morfologia e fisiologia*. (Divulgação Agro 556, Ed.) (1st ed.).
- Palonen, P.** (1999a). *Carbohydrates Concentrations and Dormancy as Related to Winter Hardiness in Red Raspberry*. 36, Helsinki.
- Palonen, P.** (1999b). Relationship of Seasonal Changes in Carbohydrates and Cold Hardiness in Canes and Buds of Three Red Raspberry Cultivars. *Journal American Society for Horticultural Science*, 124(1245).
- Palonen, P., & Lindén, L.** (2006). Breaking Dormancy in Red Raspberry with Hot Water Treatment and its Effects on Cold Hardiness. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(2), 209–213.
- Parente, C.** (2014). *Efeito do frio artificial na quebra da dormência e produtividade do mirtilo (Vaccinium corymbosum)*. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.
- Parrie, E.** (1990). *Pollination of Hybrid Southern Highbush Blueberries (Vaccinium Corymbosum L.)*. M.S. thesis, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana.
- Pépinières Multibaies.** (2017). Southern highbush (Vacc. corymbosum hybrid). Retrieved March 5, 2017, from <http://www.multibaies.com/en/fruit-growers/our-range-of-varieties-for-fruit-growers/southern-highbush-vaccinium-corymbosum-hybrid-en/>
- Pereira Baliza, D., de Oliveira Santos, M., Donizeti Alves, J., José Guimarães, R., Luz da Cunha, R., & Alves Pereira, V.** (2011). Metabolismo da sacarose em cafeeiros submetidos a diferentes níveis de sombreamento. In *VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Araxá.
- Pfister, B., & Zeeman, S. C.** (2016). Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(14), 2781–2807.
- Pinto, R.** (2015). *Melhoria das técnicas culturais na produção de mirtilo em substrato*. Instituto Superior de Agronomia-Universidade de Lisboa.
- Popenoe, J.** (1994). Dry Weight Partitioning in Three Phenotypes of Red Raspberry. *Journal American Society for Horticultural Science*, 19(5), 940–942.
- Privé, J.-P., Sullivan, J. A., Proctor, J. T. A., & Allen, O. B.** (1993). Climate Influences Vegetative and Reproductive Components of Primocane-fruiting Red Raspberry Cultivars, 118(3), 393–399.
- Prodorutti, D., Pertot, I., Giongo, L., & Gessler, C.** (2007). Highbush Blueberry: Cultivation, Protection, Breeding and Biotechnology. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 44–56.
- Ramos, A., & Franco, M.** (2014). Gestão de rega e nutrientes em framboesas e mirtilos (culturas em solo) | Portal Agronegócios.eu.
- Raseira, M., Gonçalves, E., Trevisan, R., & Antunes, L.** (2004). *Aspectos técnicos da cultura da framboeseira*. Pelotas.
- Raya, H.** (2006). Carbon supply and demand in an annual raspberry (*Rubus idaeus* L.) Cropping system, 39–73.
- Remberg, S. F., Sønsteby, A., Aaby, K., & Heide, O. M.** (2010). Influence of Postflowering Temperature on Fruit Size and Chemical Composition of Glen Ample Raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9120–9128.
- Retamales, J. B., & Hancock, J. F.** (2012a). Blueberries, Growth and Development, 51–73.
- Retamales, J. B., & Hancock, J. F.** (2012b). The Blueberry Industry, 1–17.
- Ribani, M., Beatriz, C., Bottoli, G., Collins, C. H., Sales, I. C., & Jardim, F.** (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, 27(5), 771–780.
- Roitsch, T., & González, M.-C.** (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*, 9(12), 606–613.
- Rubio, J., Lena, G., & Ara, M.** (2014). El cultivo del frambueso. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA).

- Sá Lima, M.** (2017). Fotossíntese - Mundo Educação. Retrieved February 3, 2017, from <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/fotossintese.htm>
- Santos, L.** (2015). Fenologia do *Vaccinium Corymbosum* cv. Duke em várias regiões de Portugal Continental.
- Sauter, J. J.** (1988). Temperature-induced Changes in Starch and Sugars in the Stem of *Populus × canadensis* «robusta». *Journal of Plant Physiology*, 132(5), 608–612.
- Sequeira, C.** (2012). *Análise de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais: aplicação de HPLC-SEC-UV-IR e língua eletrônica*. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária.
- Shutak, V. G.** (1980). The cultivated highbush blueberry: twenty years of research. *Rhode Island Agricultural Experiment Station Bulletin*, 428.
- Smith A. D.** (2000). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford: Oxford University Press.
- Snyder, J., & Richey, H.** (1930). Carbohydrate composition of protected and unprotected raspberry canes. *Proceedings of the American Society for Horticultural*, 27, 146–150.
- Sønsteby, A., & Heide, O. M.** (2008). Environmental control of growth and flowering of *Rubus idaeus* L. cv. Glen Ample. *Scientia Horticulturae*, 117(3), 249–256.
- Sønsteby, A., & Heide, O. M.** (2009). Effects of photoperiod and temperature on growth and flowering in the annual (primocane) fruiting raspberry *Rubus idaeus* L.) cultivar “Polka.” *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(4), 439–446.
- Sønsteby, A., & Heide, O. M.** (2014). Cold tolerance and chilling requirements for breaking of bud dormancy in plants and severed shoots of raspberry (*Rubus idaeus*L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89(6), 631–638.
- Sousa, E., Oliveira, P., & Oliveira, C.** (2014). Efeito do frio no desempenho agronômico de duas cultivares de framboesas remontante em cultura protegida. *Pequenos Frutos*, 6, 8–9.
- Sousa, M., Curado, T., Vasconcellos, F., & Trigo, J.** (2007). *Framboesa Qualidade pós-colheita*. (Divulgação agro 556, Ed.) (6th ed.).
- Spondias.** (2005). Fotossíntese. Retrieved February 2, 2017, from <https://pt.slideshare.net/spondias/fotossntese-55619652>
- Strik, B., & Buller, G.** (2005). The Impact of Early Cropping on Subsequent Growth and Yield of Highbush Blueberry in the Establishment Years at Two Planting Densities is Cultivar Dependant. *Hortscience*, 40(7), 1998–2001.
- Sturm, A., & Tang, G.-Q.** (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science*, 4(10), 401–407.
- Swain, P. A. W., & Darnell, R. L.** (2001). Differences in Phenology and Reserve Carbohydrate Concentrations Between Dormant and Nondormant Production Systems in Southern Highbush Blueberry. *Journal American Society for Horticultural Science*, 126(4), 386–393.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., ... Shinozaki, K.** (2002). Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 29(4), 417–426.
- Teramura, A., Davies, F., & Buchanan, D.** (1979). Comparative photosynthesis and transpiration in excised shoots of rabbiteye blueberry. *HortScience*, 14, 723–724.
- The NC Blueberry Journal: Blueberry cultivar “Legacy.” (2011). Retrieved March 5, 2017, from <http://ncblueberryjournal.blogspot.pt/2011/08/blueberry-cultivar-legacy.html>
- Tosun, M., Ercisli, S., Karlidag, H., & Sengul, M.** (2009). Characterization of Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Genotypes for Their Physicochemical Properties. *Journal of Food Science*, 74(7), 575–579.
- Trehane, J.** (2009). *Blueberries, Cranberries and Other Vacciniums*. Timber Press, Incorporated.
- Tromp, J.** (1983). Nutrient reserves in roots of fruit trees, in particular carbohydrates and nitrogen. *Plant and Soil*, 71(1–3), 401–413.

- Tromp, J., Webster, A. D., & Wertheim, S. J.** (2005). Soluble and Storage Carbohydrates. *Fundamentals of Temperate Zone Tree Fruit Production*, 361–382.
- Valenzuela-Estrada, L.** (2008). *Above-and belowground physiology in Vaccinium corymbosum L.(northern highbush blueberry) in response to water stress and reproductive effort*. The Pennsylvania State University.
- Vasilakakis, M., & Dana, M.** (1978). Influence of primocane inflorescence removal on number of inflorescences and suckers in 'Heritage' red raspberry. *HortScience*, (13), 700–701.
- Vilén, E. M.** (2013). *Studies of carbohydrate structure, properties and interactions by nmr spectroscopy* (75th ed.).
- Waister, P., & Wright, C.** (1989). Dry matter partitioning in cane fruits, 51–61.
- Wallaart, R.** (1980). Distribution of sorbitol in Rosaceae [including data on apples, cherries, raspberries, strawberries and pears]. *Phytochemistry*, 19, 2603–2610.
- White, J., Wainwright, H., & Ireland, C.** (1998). Interaction of endodormancy and paradormancy in raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Annals of Applied Biology*, 132(3), 487–495.
- Whitney, G. G.** (1982). The productivity and carbohydrate economy of a developing stand of *Rubus idaeus*. *Canadian Journal of Botany*, 60(12), 2697–2703.
- Williams, I. H.** (1959). Effects of Environment on *Rubus Idaeus* L.: IV. Flower Initiation and Development of The Inflorescence. *Journal of Horticultural Science*, 34(4), 219–228.
- Yunqing, C., Wanting, G., Huidi, Z., Jianfeng, L., Yixin, Z., & Bowen, Y.** (2015). Photosynthetic Characteristics of Different Raspberries Cultivars. *Journal of Northeast Forestry University*, 5, 5–17.
- Zamski, E., & Schaffer, A.** (1996). *Photoassimilate distribution in plants and crops: source--sink relationships. Books in soils*. New York: Marcel Dekker.
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., & Smith, A. M.** (2010). Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 209–234.