

**ESTUDO DOS FATORES QUE AFETAM O NÚMERO E VIABILIDADE
DE GOMOS DE RAIZ NA MULTIPLICAÇÃO DE *RUBUS IDAEUS L.***

João Miguel Santos Viegas de Oliveira

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadores: Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira

Doutor Pedro Nogueira Brás de Oliveira

Júri:

Presidente: Joaquim Miguel Rangel da Cunha Costa (PhD), Professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Henrique Manuel Filipe Ribeiro (PhD), Professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Maria Teresa Moreira Valdivieso (PhD), Investigadora auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Pedro Nogueira Brás de Oliveira (PhD), Investigador auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

2022

Agradecimentos

Guardo este espaço para transmitir a minha gratidão por todo o apoio que me deram ao longo destes dois anos de percurso no Instituto Superior de Agronomia. Quero agradecer:

- À professora e orientadora interna da minha dissertação, Cristina Oliveira, por todo o apoio, ajuda, disponibilidade, simpatia e conhecimentos que me transmitiu ao longo destes dois anos.

- Ao professor e orientador externo da minha dissertação, Pedro Brás de Oliveira, por todo o apoio, ajuda, disponibilidade, boa disposição, conhecimentos que me transmitiu e pela visita à First Fruit. Queria agradecer por me acolher neste projeto, e por me ajudar a crescer enquanto pessoa e profissional.

- Ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária e à Beira Baga por fornecerem o material vegetal e instalações para a realização dos ensaios. Em especial à Cândida, ao Francisco, ao Manuel e à Teresa, por todos os conhecimentos que me transmitiram, e por me fazerem sentir em casa enquanto permaneci nas instalações.

- À Catarina Lourenço por ser a grande pessoa que é, e por ser uma amiga para a vida. Pela amizade e ajuda ao longo destes cinco anos.

- Aos meus amigos Afonso, Gonçalo e Rodolfo pela amizade de longa data, pelo apoio, e por saber que estão sempre ao meu lado quando preciso.

- Ao Leonel, Florbela e Catarina Duarte por todo o carinho e apoio que me deram ao longo destes anos.

- À minha namorada e amiga Joana, por todo o amor e carinho que me dá, estar sempre a meu lado e enfrentar comigo, juntos, os obstáculos que têm aparecido nas nossas vidas.

- Aos meus avós por terem aturado a peste que eu era quando era pequenino e um grande pedido de desculpas pelas dores de cabeça que lhes dei.

- Aos meus pais por todo o esforço que fizeram para me proporcionar os momentos que me fizeram crescer e tornar-se na pessoa que sou hoje. Por acreditarem em mim, estarem sempre dispostos a ouvir-me e dar-me um ombro. Queria dizer-lhes que tenho muito orgulho neles e que agradeço do fundo do coração tudo o que fizeram por mim.

- Ao meu irmão por me aturar durante os meses que estive no INIAV, por toda a força que me dá quando penso em desistir, e não me deixar baixar os braços. Por todo o amor e carinho que me deu e dá. Ficarás para sempre gravado em mim.

O mais engraçado é que esta Dissertação juntou três Oliveiras.

Um grande obrigado a todos!

Resumo

Este estudo vem da necessidade de saber mais sobre a multiplicação vegetativa de plantas de framboesa para maximizar a produção de plantas em viveiros.

Num primeiro ensaio, observou-se a interação do tempo de permanência dos sistemas radiculares em frio, (sem frio, 15 dias, 30 dias e 45 dias a cerca de 5 °C) com a idade da planta, correspondente à data de plantação na Herdade da Fataca (16/03, 06/04 e 27/04). No segundo ensaio, analisou-se se a quantidade de gomos nas raízes capazes de produzir lançamentos novos nos genótipos é independente da família de melhoramento que lhes deu origem. Foram utilizados quatro genótipos por família de três famílias. No terceiro ensaio, estudou-se a estrutura morfológica e anatômica dos gomos radiculares. Foram utilizadas as plantas mais novas (27/04) e mais velhas (16/03), submetidas sem frio e com a maior quantidade de frio realizada neste estudo (45 dias contínuos de frio).

No ensaio relativo à interação de tempo de permanência em frio e a idade da planta, verificou-se que apenas o fator frio teve influência significativa no número de rebentos obtidos, mostrando-se o tratamento de 30 dias o mais eficaz. Verificou-se a independência dos genótipos relativamente à família, isto é, na mesma família surgiram genótipos com diferenças de cerca de 30 lançamentos de raiz, tendo o genótipo 10F66 emitido 1 lançamento e o 10F44 cerca de 31 lançamentos. Construiu-se uma escala morfológica (constituída dos 5 estádios, de zero a quatro) e outra anatômica (constituída por 4 estádios, de zero a três) permitindo verificar que os gomos que dão origem a lançamentos que posteriormente originam novas plantas, provêm da zona periférica da raiz. Observou-se a presença de dois gomos morfológicamente semelhantes, porém, com epidermes clara e escura, mas sem clara distinção nos primeiros estádios. Assim, apenas pode-se classificar morfológicamente como gomo vegetativo, um gomo a partir do estágio 2.

Palavras-chave: Anatomia, Framboesa, Genótipo, Morfologia, Vernalização.

Abstract

This study comes from the need to know more about vegetative multiplication of raspberry plants to maximize plant production in nurseries.

In a first trial, it was observed the interaction of the time of the roots in cold chamber (without chilling, 15 days, 30 days and 45 days at about 5 °C) with the age of the plant, corresponding to the date of planting in the Herdade da Fataca (16/03, 06/04 and 27/04). In the second trial, it was analyzed whether the number of buds in the roots capable of producing suckers in genotypes is independent of the breeding family. Four genotypes were used per family of three families. In the third trial, the morphological and anatomic structure of root buds was studied. The younger (27/04) and oldest (16/03) plants submitted without chilling and with the highest amount of chilling performed in this study (45 days) were used.

In the assay related to the interaction of chilling and plant age, it was found that only the chilling factor had a significant influence on the number of suckers obtained, showing the treatment of 30 days the most effective. It was verified the independence of the genotypes in relation to the family, that is, in the same family there were genotypes with differences of about 30 suckers, with genotype 10F66 emitting 1 sucker and 10F44 about 31 suckers. A morphological scale (consisting of the 5 stages, from zero to four) and another anatomical scale (consisting of 4 stages, from zero to three) was constructed, allowing to verify that the buds that give rise to suckers that later originate new plants, come from the peripheral zone of the root. The presence of two morphologically similar buds was observed, however, with light and dark epidermis, but without clear distinction in the first stages. Thus, one bud can only be morphologically classified as vegetative bud, from stage 2.

Keywords: Anatomy; Chilling; Genotype; Morphology; Raspberry.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Índice.....	iv
Índice de Figuras	v
Índice de Quadros.....	vi
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	2
2.1. Caracterização da cultura.....	2
2.1.1. Ciclo Biológico	2
2.2. Propagação assexuada de plantas de Framboesa.....	5
2.2.1. Sistema Radicular.....	6
2.2.1.1. Raízes Adventícias	8
2.2.1.2. Gomos Vegetativos.....	10
2.2.1.3. Fatores importantes na propagação de plantas	12
2.2.1.3.1. Exposição ao frio	13
3. Material e métodos.....	16
3.1. Localização dos ensaios	16
3.2. Ensaio 1 – Interação entre idade e frio	16
3.3. Ensaio 2 – Interação entre família e genótipo	20
3.4. Ensaio 3 – Morfologia e anatomia dos gomos radiculares	23
3.5. Tratamento dos dados	28
4. Resultados e discussão	29
4.1. Ensaio 1 – Interação entre idade e frio	29
4.1.1. Número de rebentos	30
4.1.2. Peso radicular	33
4.1.3. Peso de lançamentos emergidos previamente à lavagem do sistema radicular..	35
4.1.4. Peso da touça.....	39
4.2. Ensaio 2 – Interação entre família e genótipo	40
4.2.1. Número de rebentos	41
4.2.2. Peso da matéria seca do sistema radicular	42
4.3. Ensaio 3 – Morfologia e anatomia dos gomos radiculares.....	44
5. Conclusão.....	50
6. Referências Bibliográficas	51
ANEXOS.....	56

Índice de Figuras

Figura 1 – Diagramas que mostram partes de plantas de framboesa jovens. (Fonte: Hudson 1959).	3
Figura 2 - Esquema exemplificativo do corte dos lançamentos do ano aos dez nós (Fonte: Oliveira et al, 2007).....	4
Figura 3 – Localizações reportadas da origem de raízes adventícias em herbáceas (*) (Fonte: Lovell & White, 1986).....	6
Figura 4 – Organização de uma raiz primária em <i>Arabidopsis thaliana</i> . (Adaptado de: Perrot-Rechenmann, 2013 em <i>Plant Roots the Hidden Half</i>).....	7
Figura 5 – Emergência de raiz lateral em <i>Arabidopsis thaliana</i> . (Adaptado de: Jansen et al., 2013 em <i>Plant Roots the Hidden Half</i>).	9
Figura 6 - Organogênese de raiz lateral. Sucessivos estádios da formação de primórdio de raiz lateral, como descrito por Malamy & Benfey (1997b). (Fonte: Jansen et al., 2013 em <i>Plant Roots the Hidden Half</i>).	9
Figura 7 - Fases de desenvolvimento da planta da framboesa e aspetos vegetativos e florais ao longo do seu ciclo. (Fonte: Hudson, 1958).....	11
Figura 8 - Localização das instalações. (Azul – Edifício; Vermelho – Estufas)	16
Figura 9 – Vaso de sete litros com sistema radicular da variedade Kweli	17
Figura 10 – Bancada com divisórias em esferovite, onde foi montado o Ensaio 1.	18
Figura 11 – Esquema de colocações dos blocos, seguindo um modelo completamente casualizado. A seta é referente ao local onde foi tirada a fotografia da figura 10.	18
Figura 12 – Tipologia de placa de alvéolos utilizada para o primeiro enraizamento dos rebentos.	19
Figura 13 – Pesagem de matéria seca após uma semana em câmara de secagem.	20
Figura 14 – Esquerda: Floreira de 36 litros com três sistemas radiculares. Direita: Pesagem de sistema radicular para garantir peso mínimo necessário de repetição.	21
Figura 15 - Bancada com divisórias em esferovite, onde foi montado o Ensaio 2.....	22
Figura 16 - Esquema de colocações dos blocos, seguindo um modelo completamente casualizado. A seta é referente ao local onde foi tirada a fotografia da figura 15.	22
Figura 17 - Caixa de Petri com raiz e perlite.....	24
Figura 18 - Cestos com caixas de Petri utilizados no protocolo 2.....	25
Figura 19 - Micrótomo utilizado para realização de cortes histológicos (Leica RM2255).	26
Figura 20 – Placa de aquecimento utilizada na preparação de lâminas utilizadas no ensaio 3.	27
Figura 21 - Diagrama de extremos e quartis de número de rebentos do fator tempo em frio, em framboesa da variedade Kweli.	30
Figura 22 – Diagrama de extremos e quartis do número de rebentos do fator idade de plantação, em framboesa da variedade Kweli.	32
Figura 23 – Diagrama de extremos e quartis do peso de sistema radicular (em gramas), do fator número de horas de frio, em framboesa da variedade Kweli.	34
Figura 24 – Diagrama de extremos e quartis do peso do sistema radicular em gramas do fator idade de plantação, em framboesa da variedade Kweli.	35
Figura 25 – Diagrama de extremos e quartis do peso em gramas de rebentos emergidos previamente à lavagem do sistema radicular, do fator número de horas de frio, em framboesa da variedade Kweli. .	36

Figura 26 - Diferença entre rebentos emergidos previamente à lavagem dos sistemas radiculares de idade 06/04, de tratamento em frio de 30 dias (imagem da esquerda) e tratamento sem frio (imagem da direita).	37
Figura 27 – Diagrama de extremos e quartis do peso em gramas de rebentos emergidos previamente à lavagem do sistema radicular, do fator idade de plantação, em framboesa da variedade Kweli.....	38
Figura 28 – Diagrama de extremos e quartis do peso em gramas das touças no fator idade na variedade Kweli.	39
Figura 29 – Diagrama de extremos e quartis do número de lançamentos de raiz em cada genótipo, em framboesa.	41
Figura 30 – Diagrama de extremos e quartis do peso da matéria seca do sistema radicular (em gramas) em cada genótipo, em framboesa.	43
Figura 31 - Escala morfológica de gomos de raízes adventícias em framboesa.	45
Figura 32 – Escala histológica de gomos de raízes adventícias em framboesa.....	47
Figura 33 - Diferenciação morfológica e anatômica dos gomos com epiderme clara e escura.....	48

Índice de Quadros

Quadro 1 – Relação de período do ano com comprimento dos dias e temperaturas e respectivos comportamentos (Adaptado: Williams, 1959).	4
Quadro 2 – Tabela de correspondência de genótipos e famílias utilizadas no Ensaio 2.	21
Quadro 3 - Média do número de rebentos, do peso do sistema radicular, do peso da touça, do peso dos lançamentos retirados previamente à lavagem dos sistemas radiculares, e peso da matéria seca do sistema radicular consoante a idade e tempo de permanência no frio para a cultivar Kweli.	29
Quadro 4 - Médias, Erro padrão e probabilidade de teste F de variáveis de enraizamento, consoante os fatores idade e tempo de permanência em frio.	33
Quadro 5 - Médias, Erro padrão e probabilidade de teste F de variáveis resposta, consoante os fatores família, genótipo e sua interação.	40
Quadro 6 - Médias de número de rebentos, número de rebentos enraizados e taxa de enraizamento, consoante os fatores família, genótipo e sua interação.....	42

1. Introdução

A framboesa (*Rubus idaeus L.*) é uma cultura cada vez com mais importância económica em Portugal, 25 276 toneladas (INE, 2020), e na Europa, 610 900 toneladas (FAOSTAT, 2020). Com o aumento de expansão territorial e consequentes produções, os viveiristas necessitam de arranjar métodos para aperfeiçoar a propagação de plantas para venda de plantas de qualidade a produtores.

A framboesa é uma planta semilenhosa, o que significa que contém um sistema radicular típico de plantas lenhosas, ou seja, um sistema radicular perene, no qual, se identifica a particularidade de criação de lançamentos a partir do sistema radicular. Embora esteja caracterizada a existência de gomos adventícios no sistema radicular, a morfologia é praticamente desconhecida. Por outro lado, a parte aérea desta planta é herbácea, no primeiro ano de crescimento, tendo a capacidade de lenhificar os tecidos aéreos para produzir frutos no segundo ano.

Para uma boa frutificação, é necessário satisfazer as necessidades em frio para a quebra de dormência e para o abrolhamento dos gomos. Para maximizar a propagação de plantas de framboesa, é necessário conhecer melhor os comportamentos, desde a criação de raízes, até à emergência de gomos de raiz e os fatores que influenciam estes. São três os fatores mais importantes que determinam o número de gomos de raiz num sistema radicular. O fator genótipo, para o qual se sabe que existe um padrão para as diferentes variedades comerciais, mas não, dentro de uma mesma família num programa de melhoramento. O fator frio determinante no abrolhamento dos gomos de um lançamento, é fundamental avaliar se existe uma mesma necessidade de frio nos gomos radiculares. O fator idade, em que plantas mais velhas podem possuir um sistema radicular mais desenvolvido, torna-se importante avaliar se o número de gomos existentes em sistemas radiculares, seguem um padrão conforme a idade da planta. Para estudar estes fatores é necessário um conhecimento profundo da morfologia e anatomia dos gomos de raiz.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito dos fatores genótipo, idade e frio a que devem ser submetidas as raízes de framboesa, para que estas tenham um maior número de gomos de raiz e se a sua viabilidade possa ser aumentada. Foi também possível aumentar o conhecimento da morfologia e anatomia dos gomos de raiz.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Caracterização da cultura

As framboesas (*Rubus* sp.) são uma cultura economicamente importante em todas as regiões temperadas do mundo. O fruto da planta da framboesa é abundante em polifenóis antioxidantes, nomeadamente antocianinas, as quais previnem diversas doenças humanas, sendo assim excelentes produtos para a saúde humana (Skrovankova *et al.*, 2015).

As plantas de framboesa pertencem à família das *Rosaceae*, género *Rubus*, que inclui plantas herbáceas, perenes e bienais, e está subdividido num elevado número de subgéneros. A propagação desta planta pela Europa é devida aos romanos, pelo que se considera que a sua origem é a Ásia Menor. Em Portugal, as principais regiões produtoras de *Rubus idaeus* L. são o Sotavento Algarvio e o Sudoeste Alentejano.

Visto que a sua origem é na Ásia Menor, as condições climáticas mais favoráveis são invernos amenos e verões longos e suaves, considerando-se que os fatores climáticos que mais influenciam a adaptação e a produtividade da cultura são a temperatura, a precipitação, a humidade relativa e o vento. Relativamente à temperatura, esta necessita de frio invernal para que haja quebra da dormência, porém, no período de floração a mesma é suscetível a baixas temperaturas (AJAP, 2017).

A planta da framboesa por norma tem uma altura entre os 40 e 60 cm e um sistema radicular fasciculado, sendo suscetível a encharcamento e preferindo solos profundos e bem drenados. É a partir deste sistema radicular que todos os anos surgem novos lançamentos que originam novas plantas idênticas à planta mãe.

As flores da framboesa são hermafroditas, iniciando a sua floração do ápice para a base. O fruto é uma drupa constituída por múltiplas drupéolas, as quais, necessitam de boa humidade relativa para que estes tenham a qualidade ou dimensão desejada.

2.1.1. Ciclo Biológico

Na produção de framboesa, as plantas podem ter ciclos culturais com aspetos distintos, distinguindo-se em dois tipos: variedades não remontantes e variedades remontantes.

As variedades não remontantes são variedades em que a frutificação apenas acontece nos lançamentos de segundo ano, na qual a dormência foi quebrada no inverno. São variedades bienais, isto é, no primeiro ano apenas são vegetativos, enquanto que no segundo ano se dá a diferenciação floral e posteriormente a produção de frutos.

Dias curtos e horas de frio limitam o crescimento vegetativo da planta, passando esta a uma fase de quebra de dormência. Quando as horas de frio são satisfeitas e as temperaturas aumentam, começa-se a observar a abrolhamento dos gomos florais e radiculares, os quais vão dar origem a inflorescências e lançamentos de primeiro ano (Figura 1).

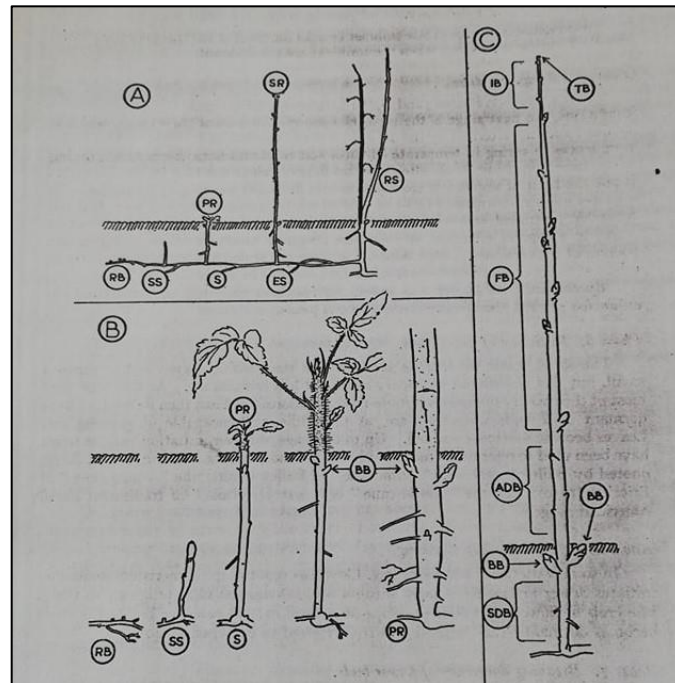


Figura 1 – Diagramas que mostram partes de plantas de framboesa jovens. A – Lançamentos em vários estádios de desenvolvimentos em plantas de dois anos de idade no outono; B – Crescimento de lançamentos de raiz, apresentando abrolhamento precoce de gomos basais que fornecem as próximas gerações de lançamentos frutíferos; C – Classificação de gomos num lançamento maturo; Em que: RB – Gomos de raiz; SS – Rebentos subterrâneos, alongados mas ainda não emergidos; S – Rebento emergente com roseta primária; PR – Primeiras folhas acima do nível do solo; ES – Lançamento alongado, com uma roseta secundária terminal (SR); RS – Lançamento de restituição; TB – gomo terminal; IB – Gomos imaturos; FB – Gomos frutíferos; ADB – Gomos aéreos dormentes; BB – Gomos basais, a partir dos quais irão surgir lançamentos restituição; SDB – Gomos dormentes subterrâneos; PR – Raiz parental que conecta o progenitor com o lançamento. (Fonte: Hudson 1959).

As variedades remontantes são variedades em que a diferenciação floral dos gomos e a frutificação ocorre nos lançamentos do ano, durante o período de crescimento. Estas são plantadas na primavera e os frutos colhidos no outono, podendo ainda haver casos de obtenção de uma segunda colheita se houver uma poda após a primeira. As necessidades de frio destas variedades são menores que nas não remontantes. Nestas plantas, inicialmente, para se obter uma segunda produção, realizava-se uma poda ao nível do solo, após a primeira produção, fazendo a planta criar biomassa não útil, prejudicando as produções no outono. De forma a minimizar a formação dessa biomassa, passou-se a fazer um corte no décimo nó, para que a planta apenas se concentre na produção de lançamentos laterais para a produção de frutos. Na

Figura 2 encontra-se exemplificado esse tipo de corte otimizado para a produção de framboesas de melhor qualidade.

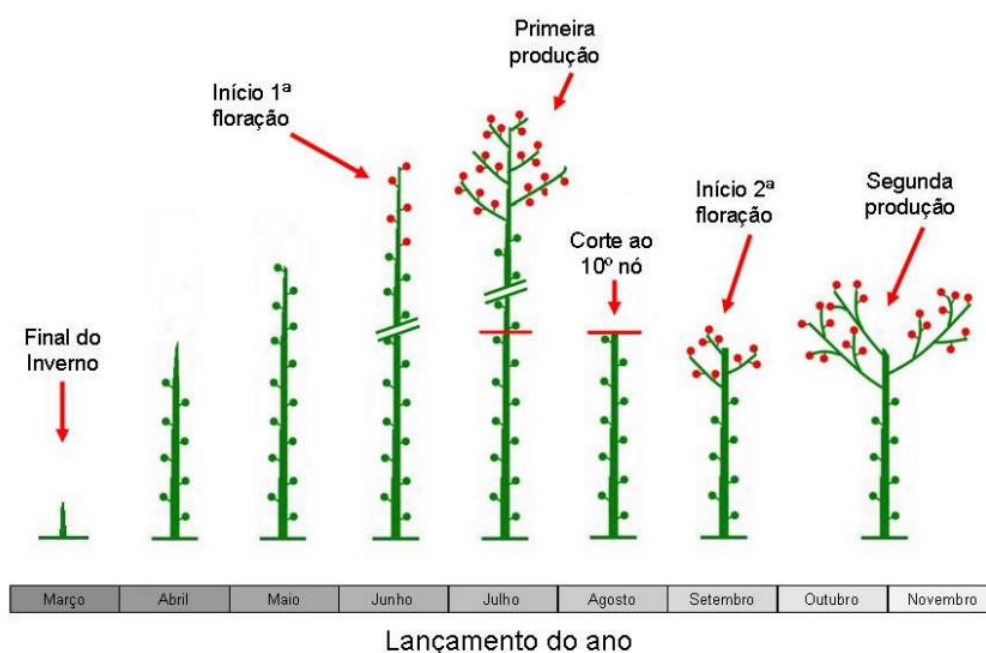


Figura 2 - Esquema exemplificativo do corte dos lançamentos do ano aos dez nós (Fonte: Oliveira *et al*, 2007).

De forma a simplificar o entendimento do ciclo biológico da cultura, Williams (1959) fez uma correspondência entre os períodos do ano, tamanho dos dias e temperaturas com os comportamentos da planta da framboesa (Quadro 1).

Quadro 1 – Relação de período do ano com comprimento dos dias e temperaturas e respectivos comportamentos (Adaptado: Williams, 1959).

Período do Ano	Comprimento do dia e temperaturas	Comportamentos da planta da Framboesa
Agosto - Novembro	Encurtamento dos dias e diminuição das temperaturas.	Emergência de lançamentos do período de outono; Término do alongamento de lançamentos vegetativos.
Setembro - Novembro	Encurtamento dos dias e diminuição das temperaturas.	Rosetas terminais das folhas encontram-se formadas; gomos basais na zona de substituição aumentam de tamanho.
Novembro - Fevereiro	Os dias são os mais curtos e as temperaturas as mais baixas.	Aparenta não haver desenvolvimento de lançamentos que já emergiram, ou a emergência de novos; caem folhas das rosetas terminais.
Março - Início de Maio	Aumento da duração dos dias e subida das temperaturas.	Renovação da atividade dos meristemas apicais dos lançamentos emergentes; abertura de novas folhas e lançamentos começam a alongar no eixo original de crescimento; emergência de novos lançamentos, que alongam sem formar roseta e sem clara diferenciação definida de gomos basais na zona de reposição.
Meio de Maio - Julho	Os dias têm a maior duração e as temperaturas as mais altas.	Período de máximo alongamento dos lançamentos; não há emergência de novos lançamentos.

2.2. Propagação assexuada de plantas de Framboesa

A Propagação assexuada, ou seja, a reprodução a partir de partes vegetativas da planta mãe, é possível porque cada célula tem a informação genética necessária para regenerar uma planta (totipotência). A reprodução pode ocorrer a partir da formação de raízes adventícias e rebentos, ou através da união de partes vegetativas por enxertia.

Existem diversas formas de propagação assexuada de plantas de framboesa: dentre as quais se destacam a micropropagação e a propagação vegetativa.

A propagação vegetativa envolve apenas divisões celulares mitóticas que mantêm o genoma da planta. A este processo dá-se o nome de clonagem, e os indivíduos que provêm deste processo são chamados de clones. Este tipo de propagação implica que não haja a fase juvenil, permitindo que no primeiro ano se obtenha floração. Economicamente falando, a propagação vegetativa permite eliminar a fase juvenil e assim atingir a maturidade reprodutiva num curto espaço temporal. A clonagem implica que todos os membros deste processo tenham o mesmo genótipo, permitindo que haja uma uniformidade fenotípica, tendo uma produção mais regular. (Hartmann et al., 1990)

A framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.) é propagada comercialmente através da sua capacidade de produzir rebentos a partir das suas raízes. Este comportamento é maximizado através do corte dos lançamentos ao nível do solo (Wan *et al.*, 2006) para induzir a produção de lançamentos na bancada de propagação (Grubb and Harris, 1945).

Os lançamentos que emergem a partir de gomos de raízes adventícias produzem raízes adventícias quando removidos da raiz (Williams & Hudson, 1956; Chambers, 1961). Desta forma, centenas de novas plantas podem ser produzidas a partir de uma única planta (Heydecker & Marston, 1968).

As plantas de framboesa podem ser transplantadas de diversas formas, porém, a mais usual é através de transplantação de gomos de raiz dormentes no primeiro inverno depois do seu crescimento a partir das raízes parentais. Ao plantar o progenitor no inverno, e um ano depois, cortar ou transplantar alguns novos gomos que cresceram, deixando maior parte das raízes do solo, podemos obter clones da planta mãe, ou seja, com características idênticas às do progenitor (Hudson, 1954).

Com o desenvolvimento dos gomos do sistema radicular, começa crescimento vegetativo, porém os lançamentos provenientes destes gomos podem surgir ao longo de todo o ciclo da cultura.

Torna-se assim necessário perceber o comportamento do sistema radicular, para se poder enquadrar o surgimento dos gomos ao longo do ciclo biológico da cultura.

2.2.1. Sistema Radicular

Quase todas as plantas vasculares têm raízes. Apesar de terem formas diferentes, todas têm uma função comum: absorção de água e solutos e fixar a planta ao substrato. Elas atuam também como órgãos de armazenamento de alimento e como estruturas perenes.

A semente contém uma radícula ou um meristema radicular no embrião, a partir do qual, a primeira raiz se desenvolve. Em primeiro lugar, a raiz ramifica e depois alonga, para produzir um sistema radicular ramificado. Enquanto que lançamentos laterais nos troncos são originados a partir de tecidos periféricos, raízes laterais começam a se formar no periciclo (Figura 3). O início do aparecimento de raízes laterais está relacionado com diversos reguladores de crescimento. (Torrey, 1976).

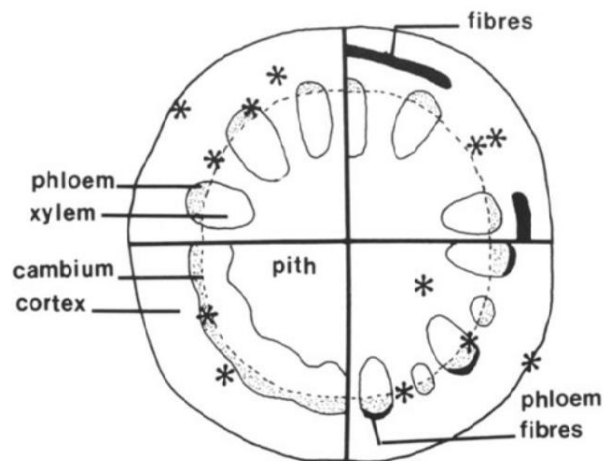


Figura 3 – Localizações reportadas da origem de raízes adventícias em herbáceas (*) (Fonte: Lovell & White, 1986).

O crescimento da primeira raiz resulta de uma continuada produção de novas células, sustentada pela divisão celular, dentro do meristema apical da raiz. Após diversos ciclos divisões celulares, células meristemática da raiz cessam a sua capacidade de realizar mitoses, alongam e entram na diferenciação. Estes processos conferem uma organização longitudinal à raiz.

O termo meristema é usado para referir um conjunto de células numa planta que são capazes de dar origem a um órgão (Von Nägeli, 1858). Esau (1965) sugeriu uma definição mais moderna de meristema, em que, um meristema é composto por um grupo de células ativas que se dividem ao longo da vida de uma planta, para produzir novas células, tecidos e órgãos.

A secção final de uma nova raiz, através de uma perspetiva longitudinal (Figura 4), tem quatro regiões de células, de diferentes características. Na extremidade, existe uma massa celular chamada de coifa. Atrás, encontra-se um ponto de crescimento, uma pequena região meristemática, de paredes finas e células cúbicas com um citoplasma denso. A partir do momento em que começa a haver divisão celular, algumas células são adicionadas à coifa e outras à região de alongamento localizada acima da zona meristemática. As células recentemente formadas na base da região de alongamento, perdem a sua capacidade de expansão e diferenciam-se em epiderme, córtex e cilindro vascular (periciclo, tecidos vasculares e medula).

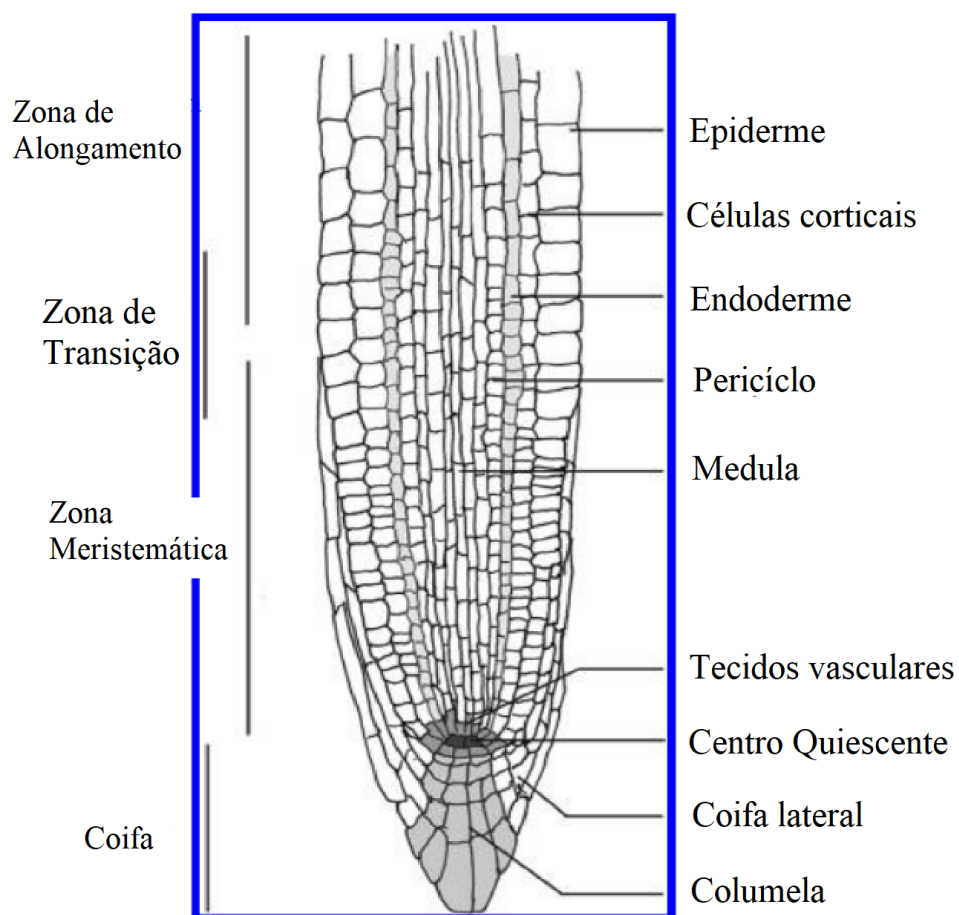


Figura 4 – Organização de uma raiz primária em *Arabidopsis thaliana*. (Adaptado de: Perrot-Rechenmann, 2013 em *Plant Roots the Hidden Half*).

Próximo da extremidade da raiz, um nicho de células indiferenciadas é formado pelo Centro Quiescente (QC) e um pequeno grupo de células indiferenciadas chamadas de iniciais, dão origem a cada fila de células da raiz. Na extremidade da raiz, células indiferenciadas filhas rapidamente se diferenciam em células columela, que contêm estatólitos, que estão envolvidos na sensibilidade da gravidade. Lateralmente, as células indiferenciadas dividem-se e dão origem

à coifa lateral. Outras células indiferenciadas dão origem à epiderme, córtex, endoderme, periciclo e células do cilindro vascular. O número de células de cada tipo varia consoante as espécies das plantas, mas a organização radial em círculos é idêntica em todas as plantas. (Perrot-Rechenmann, 2013)

Consoante o envelhecimento do sistema radicular, existe um aumento de suberização das superfícies. Apenas as raízes recentemente formadas encontram-se sem suberina, e a superfície é pequena comparada com a superfície do sistema radicular (Kramer, 2012)

Segundo (Meyer & Peterson, 2013), a suberina nas paredes celulares tem um papel principal na captação de água e iões, proteção contra stresses ambientais e patogénicos.

2.2.1.1. Raízes Adventícias

A disponibilidade e distribuição de água e nutrientes no solo varia consoante o tempo e espaço (Hodge, 2006). A adaptação da arquitetura do sistema radicular da planta através da iniciação e alongamento das raízes é uma estratégia importante para lidar com as mudanças das condições nutricionais (Malamy, 2005; Hodge *et al.*, 2009). A formação de raízes laterais permite à planta explorar o solo e chegar a caminho ricos em nutrientes. Por outro lado, as plantas podem conservar energia evitando o crescimento de raízes laterais em zonas de escassez de água e nutrientes, apostando no crescimento da raiz principal, permitindo atingir maiores profundidades (Deak & Malamy, 2005; Malamy, 2005).

Durante a iniciação de raízes laterais, diversas células do periciclo tornam-se meristemáticas e começam a dividir-se para formar um primórdio lateral que cresce através da endoderme, córtex e epiderme. Antes da raiz lateral perfurar a superfície dos tecidos da raiz principal, ela desenvolve um meristema apical bem definido e uma coifa (Torrey, 1976). O local onde se dá a iniciação de raiz lateral é na zona de diferenciação, por assim se dizer, na zona meristemática. Nessa zona, células do periciclo têm que se diferenciar ou manter o seu estado mitótico, uma vez que saem do meristema apical radicular (Malamy & Bendey, 1997a,b) (Figura 5 e 6).

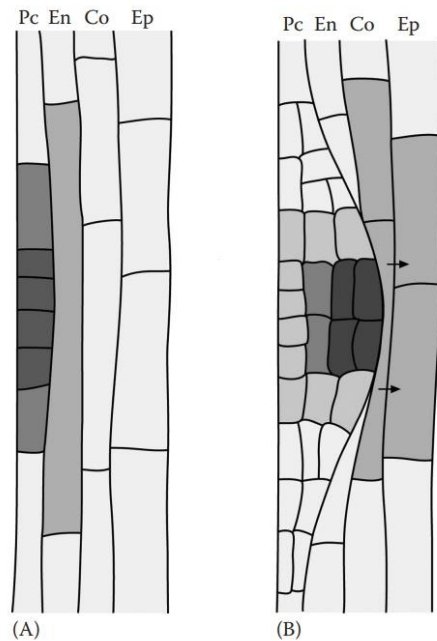


Figura 5 – Emergência de raiz lateral em *Arabidopsis thaliana*. A intensidade da cor cinzenta corresponde ao aumento de concentrações de auxina e as setas indicam o transporte de auxinas. Pc, periciclo; En, endoderme; Co, córtex; Ep, epiderme (Adaptado de: Jansen *et al.*, 2013 em *Plant Roots the Hidden Half*).

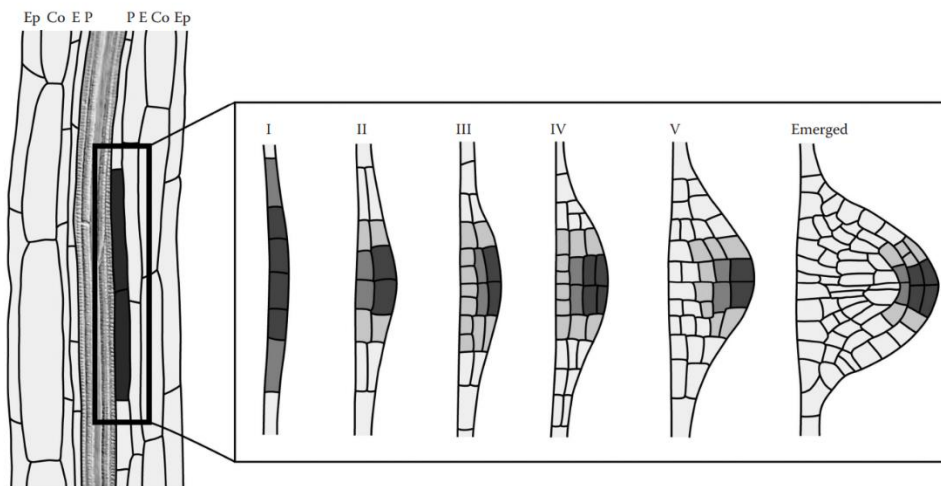


Figura 6 - Organogênese de raiz lateral. Sucessivos estádios da formação de primórdio de raiz lateral, como descrito por Malamy & Benfey (1997b). A intensidade da cor cinzenta corresponde a aumento de concentrações de auxina. Ep, epiderme; Co, córtex; E, endoderme; P, periciclo. (Fonte: Jansen *et al.*, 2013 em *Plant Roots the Hidden Half*).

O periciclo é normalmente apenas uma camada de células parenquimatosas situada entre a endoderme e os tecidos vasculares. Este retém a capacidade de crescimento meristemático, dando origem ao primórdio de raiz lateral.

Tal como Torrey (1976) mencionou anteriormente, os reguladores de crescimento estão presentes na iniciação de raízes laterais, tomando a auxina e a citocinina como reguladores predominantes no comportamento radicular.

A auxina é a principal fito hormona que inicia o enraizamento, sendo também fundamental na primeira fase de formação de raízes adventícias. Esta está envolvida no fototropismo, curvando os caules e pecíolos em direção à luz. Está também envolvida no geotropismo, o crescimento de caules diante à superfície e de raízes em profundidade, em resposta à gravidade (Kramer, 2012). O transporte de ácido indolacético (IAA) é feito através de elementos maduros do floema (Baker, 2000) e através de outras células vivas nos caules (Lomax *et al.*, 1995). Este transporte através de células vivas é unidirecional (Friml & Palme, 2002).

As citocininas são outro grupo de hormonas reguladoras de crescimento implicadas na organogénese. As citocininas são principalmente produzidas no sistema radicular e transportadas para os lançamentos durante a transpiração (Letham, 1994). Altas concentrações de citocininas inibem o alongamento das raízes primárias e laterais (Hopkins, 1999), mas promovem o desenvolvimento de gomos do caule e lançamentos (Schmuelling, 2002). A acumulação de citocininas e a redução de auxinas em plantas decapitadas é uma das principais razões da produção e crescimento de gomos vegetativos nas raízes. São substâncias que não só estimulam a divisão celular, mas também estão envolvidas em processos como a expansão celular, diferenciação de tecidos, floração, desenvolvimento de frutos e senescência (Kramer, 2012)

O etileno regula o alongamento, gravitropismo e o desenvolvimento de raízes laterais, em sua parte, devido à mediação do transporte de auxinas (Lewis & Muday, 2013).

2.2.1.2. Gomos Vegetativos

Os gomos vegetativos que posteriormente darão origem a rebentos, encontram-se normalmente em porções de raízes que crescem verticalmente ou num ângulo inclinado. Eles são especialmente comuns em locais perto do ponto em que a raiz muda de direção repentinamente e em áreas onde a produção de radículas é prolífera (Christensen, 1947). A capacidade de os gomos virem a dar origem a rebentos, varia largamente durante o ano, tendo duas épocas denominadas como “on”, a primeira de outono a inverno e a segunda de agosto a abril, e uma época chamada de “off” que vai da primavera até ao verão. Na segunda época “on”, observou-se um máximo ótimo em janeiro e fevereiro (Hudson, 1954). Segundo Williams (1959b), a maior incidência de rebentos na primeira época “on” encontra-se num raio de 20 centímetros do progenitor, enquanto que, na primavera ocorreram com maior incidência entre os 20 e os 80 centímetros.

Estes rebentos posteriormente chamados de lançamentos, passam por uma sequência de fases de ciclo cultural durante os dois anos de vida, sendo assim um indivíduo ideal para estudar os efeitos de fatores ambientais nos processos de crescimento. Como já foi mostrado por Hudson (1958), o alongamento dá-se na primavera e início de verão, sendo que Williams verificou que não houve emergência até ao outono. A maneira como as raízes se propagam em cada uma das épocas, mostra a maneira efetiva como esta semilenhosa consegue colonizar o solo e expandir-se.

Segundo Hudson (1959), a planta da framboesa passa pelas seguintes fases, Figura 7, na qual é salientado que o cessamento do alongamento, coincide com a iniciação floral dos gomos axilares.

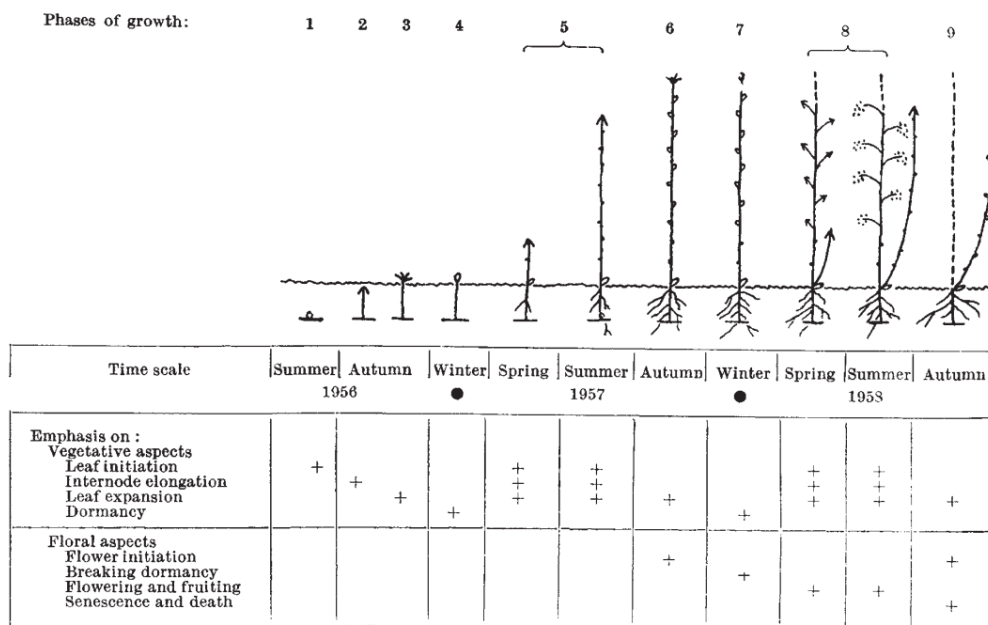


Figura 7 - Fases de desenvolvimento da planta da framboesa e aspetos vegetativos e florais ao longo do seu ciclo, em que: 1 – Iniciação do gomo de raiz; 2 – Rebento subterrâneo; 3 – Rebento emergente; 4 – Primeira dormência de inverno; 5 – Alongamento do lançamento; 6 – Iniciação dos gomos florais; 7 – Quebra de dormência dos gomos florais; 8 – Floração e frutificação; 9 – Senescência e morte. (Fonte: Hudson, 1958)

No final de outono e inverno e início de primavera, depois da desfolha, é quando as reservas de hidratos de carbono se encontram à máxima concentração no sistema radicular (Whitney, 1982; Zasada *et al.*, 1994; Landhäusser & Lieffers, 1997). Os rebentos dependem das reservas até atingirem a superfície e estabelecerem a sua área fotossintética (Schier & Zasada, 1973). Muitos estudos não suportam uma forte relação entre as reservas hidratos de carbono e o número de lançamentos (Tew, 1970; Schier & Zasada, 1973). Porém, o aumento do número de lançamento causa um aumento de competição por uma quantidade limitada de reservas, que resulta numa diminuição de peso seco por lançamento (Schier, 1972).

Por outro lado, existe a evidência que a iniciação de lançamentos é influenciada por fatores como níveis hormonais ou quantidade de nutrientes nas raízes (Eliasson, 1971a-c).

É ainda de salientar que a temperatura e a intensidade de iluminação estão positivamente correlacionadas com a percentagem de rebentos por raiz, número de rebentos, altura média e peso seco (Johansson & Lundh, 1988).

A emergência de rebentos está relacionada com o rácio de auxinas e citocininas no sistema radicular (Farmer, 1962; Eliasson, 1971a-c; Schier, 1972; Steneker, 1974). Não só o efeito da dominância apical, mas também a temperatura do solo são fatores muito importantes no controlo na iniciação de rebentos e seu lançamento (Horton & Maini, 1964; Maini & Horton, 1966; Gifford, 1967; Zasada & Schier, 1973; Shepperd, 1996). A melhor temperatura do solo, para que haja emergência de rebentos das lenhosas em geral, é de 20°C (Maini, 1967).

Quando a auxina diminui abaixo de níveis inibitórios, reservas de hidratos de carbono nas raízes fornecem a energia necessária para a iniciação de gomos e a emergência de rebentos. O alongamento do rebento permanece dependente de reservas até emergir através da superfície do solo (Schier, 1972). Quando separado da planta progenitora, os rebentos conseguem existir independentemente (Harper, 1977). O conteúdo de ácido indolacético em raízes influencia o crescimento de rebentos (Robinson & Schwabe, 1977).

2.2.1.3. Fatores importantes na propagação de plantas

Vorončihina (1967) descobriu que o crescimento máximo das raízes ocorria durante a floração e depois do final do vingamento, enquanto que Atkinson (1973) observou que a raiz ativa e o crescimento dos lançamentos ocorreram simultaneamente, ou seja, o crescimento dos lançamentos começou e acabou mais cedo que o crescimento da raiz. O tempo de crescimento da raiz, observado por Atkinson (1973), difere do descrito por Vorončihina (1967), que encontrou dois picos de crescimento radicular que era alternado com o período de frutificação e o crescimento dos lançamentos, pode ser devido a fatores como a variedade, idade da planta e as condições do solo. Esta diferença vai ao encontro do que foi mencionado por Lang *et al.* (1985) que referem que a dormência é afetada pela endodormência, mas também pela dominância apical (paradormência) e fatores externos como baixas temperaturas (ecodormência). Estes podem atuar em combinação e ter um efeito acumulativo no crescimento dos gomos, nomeadamente no final do inverno (White *et al.*, 1998).

Head (1967) verificou que quanto mais intenso for o crescimento do lançamento, maior e mais prolongado foi a redução na produção de novas raízes brancas a meio do verão, sendo

que Atkinson (1973), após registro do comprimento de raízes brancas durante 4 anos, concluiu que este tem um padrão sazonal marcado, com um pico elevado a meio do verão. Sendo que Williams (1959) constatou que lançamentos não foram produzidos pelas raízes no final do verão até ao início da primavera, isto porque as plantas estavam dormentes nessa altura do ano. Lançamentos produzidos antes do verão acabar não tiveram desenvolvimento após 0,05m, continuando durante o inverno pequenos e dormentes. Por outro lado, os que foram produzidos no início da primavera desenvolveram-se continuamente.

Simonds (1942) acreditava que alternar congelamento com degelo não quebrava a dormência nas plantas de framboesa, como mostrado pela falta de atividade cambial nas plantas que sofreram tratamento, mas é duvidável se o frio tem algum efeito apreciável em alguma atividade, como Brierley (1930) mostrou que o câmbio da framboesa não fica ativo até ao desenvolvimento dos gomos começar. Os mesmos verificaram que a dormência é quebrada mais cedo na ponta que em porções mais baixas, o que leva a acreditar que a intensidade e duração da dormência está relacionada com a duração do ciclo cultural, desenvolvendo mais tarde em ciclo curto. Desta forma, verificaram que a dormência é retida apenas se as temperaturas continuam abaixo do limiar de crescimento.

2.2.1.3.1. Exposição ao frio

A dormência sazonal, induzida por dias curtos e temperaturas baixas no final do verão e outono, é uma estratégia de adaptação importante por parte de plantas lenhosas, para a sua sobrevivência ao inverno com temperaturas frias (Wareing, 1956).

Tal como já foi observado por Mage (1975) e Williams (1959a), as plantas de framboesa entram em dormência no outono, ou seja, mal acaba a frutificação, havendo uma senescência dos lançamentos principais, altura em que as temperaturas diminuem e o fotoperíodo começa a encurtar, sugerindo que o ambiente é a causa da indução de dormência na framboesa.

Ao contrário do que Brierley & Landon (1945) verificaram, Hudson (1958) e Williams (1959b) afirmam que tanto os dias curtos como as baixas temperaturas são responsáveis pela indução da dormência, porém, são as mesmas baixas temperaturas que são necessárias para que essa dormência seja quebrada. Carew *et al.* (2000) observou que se as temperaturas não forem baixas o suficiente, a quebra da dormência pode ser ineficaz e dar origem a problemas posteriormente, tal como: quebra de gomos atrasada e pobre, dando origem a reduzida área foliar, desenvolvimento floral anormal e escasso e posteriormente pobre vingamento dos frutos.

As temperaturas frias necessárias para atingir a vernalização e para a quebra de endodormência são fornecidas pelas condições climáticas inverniais (Lang *et al.*, 1987).

As unidades de frio necessárias para a quebra de dormência são influenciadas pela idade de plantação, a variabilidade genética das cultivares e pela forma de crescimento sazonal. Existem diversas formas de estimar a vernalização necessária, mas esta é geralmente medida através da acumulação do número de horas a que a planta está sujeita a temperaturas de cerca de 4 °C, unidades de frio de acordo com os modelos que quantificam o frio para a quebra da dormência (Jennings, 1988).

Segundo Almássy & Kollányi (2016), o número de unidades de frio necessárias para a quebra de dormência em cultivares de framboesa, situam-se entre as 800 e as 1400 unidades de frio. Baseado no comportamento de outras culturas, as temperaturas ótimas de vernalização são entre 2 e 4°C (Battey *et al.*, 1998).

Segundo Rutherford & Sewell (1972), os níveis de hidratos de carbono nas raízes encontram-se mais estáveis a temperaturas baixas (próximas de 0°C), devido à diminuição da atividade enzimática que degrada os hidratos de carbono. Palonen *et al.* (2015) observou que a presença de plantas lenhosas na câmara frigorífica durante 4 semanas, originou um aumento na concentração de hidratos de carbono solúveis, diminuindo as concentrações de amido, tanto nos lançamentos, como no sistema radicular. Sakai (1966) observou que a conversão de amido a hidratos de carbono solúveis através de hidrólise, é dependente da temperatura e acelerada a temperaturas próximas de 0°C.

Williams (1959a), observou que temperaturas a rondar os 21°C após baixas temperaturas, permitiu a substituição de algumas horas de comprimento de dia, durante o alongamento dos lançamentos, sendo que Neocleous *et al.* (2005) verificou que a exposição ao frio, apesar de não ter afetado o crescimento vegetativo e a qualidade do fruto, a floração e a frutificação foram precoces. Além do mais, em experiências que efetuou, os efeitos foram melhores quando a exposição ao frio foi contínua antes do desenvolvimento da planta. Esta afirmação vai ao encontro a Carew *et al.* (2001) e Sønsteby & Heide (2008; 2009), que referem que para produção comercial e para fins experimentais, as raízes devem ser retiradas do campo no outono e ser feito um tratamento com frio durante várias semanas antes de serem usadas para propagação.

Na bancada de crescimento, temperaturas inferiores a 15°C fizeram com que as plantas submetidas em estufa não tivessem alongamento significativo. Para além destes aspetos, verificou-se que em comum com muitos arbustos de clima temperado, é necessário um período de baixas temperaturas para a quebra da dormência de gomos e que o crescimento dos

lançamentos provenientes de gomos radiculares não se dá enquanto não houver temperaturas mais quentes, ou seja, a rondar os 21°C (Williams, 1959a).

3. Material e métodos

Este estudo foi repartido em três ensaios. Num primeiro, estudaram-se os fatores idade da planta e número de horas de frio. No segundo, os fatores família e genótipo. No terceiro, estudou-se a morfologia e anatomia dos gomos de raiz.

3.1. Localização dos ensaios

A realização das atividades relativas à obtenção de resultados para os ensaios deste estudo, foram efetuados no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), localizado no concelho de Oeiras, no Distrito de Lisboa. As atividades foram realizadas em dois edifícios, sendo que os ensaios 1 e 2 (referentes à interação idade x frio e família x genótipo, respetivamente), foram realizadas no complexo de estufas assinaladas com marcador vermelho (Figura 8). Já o ensaio 3 (referente à Morfologia) foi realizado no Edifício Principal do Departamento de Horticultura, assinalado com marcador azul.



Figura 8 - Localização das instalações (Azul – Edifício; Vermelho – Estufas).

3.2. Ensaio 1 – Interação entre idade das plantas e número de horas de frio

Este ensaio foi realizado com o intuito de verificar se existe interação entre os fatores idade e o número de horas de frio. Por sua vez, sabe-se que plantas com mais idade, por norma, desenvolveram um sistema radicular maior, logo, o estudo desta interação foi feito não por peso, mas sim por volume. Desta forma, os fatores volume e genótipo foram descartados porque foram iguais no ensaio, pondo em questão se a idade da planta e o número de horas de frio interagem entre si e que consequências têm estes na variável resposta.

A variedade de framboesa utilizada denomina-se de Kweli, uma variedade remontante com uma boa emissão de lançamentos de raiz, que consegue produzir frutos no primeiro ano. A unidade amostral foram vasos de sete litros (cada um com sistema radicular de duas plantas) (Figura 9).



Figura 9 – Vaso de sete litros com sistema radicular da variedade Kweli.

À chegada das plantas ao INIAV (Oeiras), estas foram cortadas à rasa, sobrando apenas o sistema radicular e substrato no interior dos vasos. Estes vasos foram colocados numa câmara frigorífica cuja temperatura se situava entre os 4° e 6°C, com diferentes durações: 45 dias (que corresponde a 1080 horas de frio), 30 dias (que corresponde a 720 horas de frio), 15 dias (que corresponde a 360 horas de frio) e a de controlo, que não foi submetida a tratamento de frio, totalizando assim 4 tratamentos. Os vasos colocados na câmara frigorífica continham diferentes idades, que correspondem às datas de plantação na Herdade da Fataca (localizada em Odemira), as quais foram: 16/03/2020 (que corresponde a 343 DAP (dias após plantação), 06/04/2020 (322 DAP), 27/04/2020 (301 DAP). Foram realizadas três repetições por cada modalidade, totalizando assim 36 unidades experimentais.

Previamente à lavagem dos sistemas radiculares foram retirados todos os lançamentos que surgiam à superfície do vaso. As raízes foram depois lavadas até não se separarem totalmente do substrato, secas em papel absorvente para retirar a água em excesso, mas evitando a secagem total dos sistemas radiculares. Posteriormente, estes foram pesados e instalados numa bancada no interior de uma estufa de vidro a qual foi dividida em 36 unidades experimentais com esferovite (Figura 10).



Figura 10 – Bancada com divisórias em esferovite, onde foi montado o Ensaio 1.

Após a desinfecção das bancadas e divisórias, e sua posterior divisão, a distribuição dos sistemas radiculares seguiu um modelo completamente casualizado (figura 11) com as seguintes camadas: 1 – Argila expandida; 2 – Substrato; 3 – Sistema radicular; 4 – Substrato (em que 1 é a camada mais profunda e 4 a mais superficial). O substrato utilizado consistia numa mistura de SIRO[®] fibra de coco com SIRO[®] aromáticas (1:1, v/v).

Entrada

16/3 30d R3	06/4 45d R2	27/4 30d R3	27/4 15d R1	16/3 15d R3	06/4 15d R3	16/3 45d R2	06/4 0d R1	27/4 0d R3	06/4 30d R1	27/4 45d R3	16/3 15d R2
06/4 15d R1	27/4 15d R3	16/3 0d R2	06/4 30d R3	27/4 0d R2	06/4 45d R1	06/4 15d R2	27/4 30d R2	16/3 0d R1	27/4 15d R2	16/3 30d R1	06/4 30d R3
06/4 0d R3	16/3 45d R1	27/4 45d R1	27/4 30d R1	16/3 0d R3	16/3 30d R2	06/4 0d R2	16/3 15d R1	27/4 45d R2	06/4 30d R2	27/4 0d R1	16/3 45d R3

Figura 11 – Esquema de colocações dos blocos, seguindo um modelo completamente casualizado. A seta é referente ao local onde foi tirada a fotografia da figura 10.

O ensaio teve uma duração de 60 dias, desde a instalação até ao término do ensaio. Durante o mesmo, foi realizada uma nebulização constante e nos dias em que as temperaturas

ultrapassavam os 35°C, utilizou-se uma rede de cobertura de 40% para evitar um aumento excessivo de transpiração das plantas. Os lançamentos de raiz, quando emergidos, foram destacados e colocados em placas de alvéolos (Figura 12), e após enraizamento, transplantados para vasos 9×9cm.



Figura 12 – Tipologia de placa de alvéolos utilizada para o primeiro enraizamento dos rebentos.

No final, foi quantificado o número de rebentos existentes nos sistemas radiculares previamente confinados em vasos de sete litros, de forma a podermos comparar as diferentes interações. Essa quantificação foi realizada através de cortes de rebentos emergidos e colocação nas placas de alvéolos duas vezes por semana. Após essa quantificação, foi ainda anotado a taxa de sobrevivência dos rebentos quantificados.

Posteriormente aos 60 dias, cessou-se a nebulização, para que se começasse a proceder à de secagem das raízes. Após a extração das mesmas, estas foram colocadas em tabuleiros no interior de uma câmara de secagem (Mammert) durante uma semana a 70°C, para que se pudesse realizar a pesagem das mesmas e quantificar o peso seco das raízes através de uma balança (Figura 13).



Figura 13 – Pesagem de matéria seca após uma semana em câmara de secagem.

3.3. Ensaio 2 – Interação entre família e genótipo

Entende-se por família o conjunto de plantas oriundas de um mesmo cruzamento, híbrido ou não, e por genótipo os descendentes originados desse cruzamento. Por outras palavras, ao cruzarmos duas variedades de framboesa, damos origem a uma família, que irá dar frutos, dos quais se retiram as sementes que após germinação irão originar plantas (genótipos).

O segundo ensaio teve como objetivo saber se o número de gomos e a sua viabilidade, em diferentes genótipos, são independentes das famílias que lhe deram origem. Desta forma, igualou-se o peso das raízes, para que a amostragem fosse igual em todos os genótipos, traduzindo-se a variável resposta em viabilidade dos gomos e capacidade reprodutiva.

À chegada das plantas estas foram cortadas à rasa, sobrando apenas o sistema radicular e substrato no interior das floreiras. O ensaio foi constituído por três famílias, sendo que dentro de cada uma existiram quatro genótipos¹ (Quadro 2), todos eles com a mesma idade (plantados na segunda quinzena de maio) e submetidos ao mesmo tempo de frio, 1 mês numa câmara frigorífica a 1°C (que corresponde a 744 horas de frio).

¹ Os genótipos apresentados fazem parte de um programa de melhoramento de framboesa do INIAV/Beira Baga, sobre os quais as informações são confidenciais.

Quadro 2 – Tabela de correspondência de genótipos e famílias utilizadas no Ensaio 2.

Família		Genótipos		
1F	1F4	1F15	1F65	1F81
9.2F	9.2F6	9.2F21	9.2F34	9.2F44
10F	10F44	10F50	10F58	10F66

Cada genótipo tinha uma amostragem de duas floreiras (36 litros cada) (Figura 14), a partir das quais se retirou o sistema radicular para posteriormente realizar a sua pesagem e separação em três repetições (270 g cada).



Figura 14 – Esquerda: Floreira de 36 litros com três sistemas radiculares. Direita: Pesagem de sistema radicular para garantir peso mínimo necessário de repetição.

A escolha do peso a utilizar por repetição seguiu um critério baseado em observações realizadas em anos anteriores, limitando o peso de repetições de sistemas radiculares de genótipos com maior capacidade de desenvolvimento ao peso de repetições do sistema radicular de genótipos com menor capacidade de desenvolvimento. O procedimento de montagem das bancadas (Figura 15) foi idêntico ao do ensaio 1, utilizando esferovite para a divisão da bancada em 36 blocos, mas com a distribuição na bancada do esquema da Figura 16, também seguindo um modelo completamente casualizado.



Figura 15 - Bancada com divisórias em esferovite, onde foi montado o Ensaio 2.

9.2F34 R2	1F81 R1	10F66 R3	10F50 R1	9.2F44 R2	1F4 R3	9.2F34 R1	10F44 R1	1F15 R3	10F58 R2	1F15 R2	9.2F34 R3	Entrada ↑
1F65 R1	10F58 R1	9.2F6 R2	10F44 R2	1F81 R3	9.2F44 R1	10F44 R3	1F65 R2	9.2F6 R3	1F4 R1	9.2F44 R3	10F50 R2	
1F4 R2	10F66 R2	9.2F21 R3	9.2F6 R1	1F15 R1	10F66 R1	10F50 R3	9.2F21 R1	1F81 R2	1F65 R3	10F58 R3	9.2F21 R2	

Figura 16 - Esquema de colocações dos blocos, seguindo um modelo completamente casualizado. A seta é referente ao local onde foi tirada a fotografia da figura 15.

Utilizou-se argila expandida e a mistura de substrato de SIRO[®] fibra de coco e SIRO[®] aromáticas (1:1, v/v) utilizados no ensaio 1, seguindo a mesma sequência de camadas.

O ensaio teve uma duração de 60 dias, desde a instalação até ao término do ensaio, durante o qual foi realizada uma nebulização constante e nos dias em que as temperaturas ultrapassavam os 30°C, utilizou-se uma rede de cobertura de 40% para evitar um aumento excessivo de transpiração das plantas. Os lançamentos de raiz, quando emergidos, foram destacados e colocados em placas de alvéolos, e após enraizamento, transplantados para vasos 9×9cm.

De forma a quantificar esta interação, foram analisados o número de rebentos por unidade de peso, devido à necessidade de qualificar a viabilidade dos gomos de cada genótipo, e se existe um padrão dentre os genótipos da mesma família ou diferenças entre as mesmas. Essa quantificação foi realizada através de cortes de rebentos emergidos e colocação nas placas de alvéolos duas vezes por semana.

3.4. Ensaio 3 – Morfologia e anatomia dos gomos radiculares

O terceiro ensaio teve como intuito tentar entender onde ocorre a formação do primórdio vegetativo e descrever a morfologia do gomo vegetativo ao longo do seu desenvolvimento, até este dar origem a um rebento. Desta forma, teve-se como intenção criar uma escala morfológica do gomo e outra anatômica através de cortes histológicos.

Para tal, selecionaram-se diversas raízes exemplares das plantas mais nova (27/04/2020) e mais velha (16/03/2020), sem frio e submetidas a 45 dias de frio (ou seja, os extremos dos fatores impostos neste estudo) da variedade Kweli. Como raízes exemplares considerou-se que estas continham três tipos classes de diâmetros: > 2 mm; 1-2 mm; < 1 mm (medidas com uma craveira digital). Após a quantificação do número de gomos nas raízes e separá-los pelas respectivas classes, foi possível aferir onde existia uma maior incidência desses gomos no sistema radicular.

No entanto, foi necessário alterar as condições laboratoriais, por forma a otimizar esta quantificação. Utilizou-se o seguinte protocolo:

Protocolo 1:

1. Escolheram-se raízes com as três classes de diâmetros para a sua colocação em caixa de Petri, sendo a amostra constituída por três repetições por modalidade.
2. Confinou-se uma raiz por caixa de Petri, devidamente identificada.
3. Colocou-se por cima da raiz uma camada de perlite.
4. Humidificou-se a perlite para criar um ambiente semelhante ao da propagação em estufa (figura 17).
5. Fechou-se a caixa de Petri e envolveu-se com papel de alumínio devidamente identificado.
6. Colocou-se numa câmara de crescimento, com temperatura constante de 20 °C, durante seis semanas.

7. Todas as semanas se realizou uma leitura de cada modalidade e repetição, contabilizando os números de gomos e os seus estádios, colocando as raízes na mesma caixa de Petri e re-humidificando a perlite.



Figura 17 - Caixa de Petri com raiz e perlite.

Este protocolo foi adotado para o estudo das variedades Kweli e os diferentes genótipos. Foi necessário reformular o protocolo, o qual a seguir se descreve.

Protocolo 2:

1. Escolheu-se raízes consideradas exemplares para a sua colocação em caixa de Petri, com a variedade Kweli e diferentes genótipos, sendo a amostra constituída por três repetições.
2. Confinou-se cada raiz numa caixa de Petri, devidamente identificada.
3. Colocou-se por cima da raiz uma camada de perlite.
4. Humidificou-se a perlite para criar um ambiente o mais semelhante ao da propagação em estufa.
5. Colocou-se a caixa de Petri em cestos (Figura 18) com a seguinte estrutura de camadas (ascendente): 1 – Argila expandida; 2 - Substrato; 3 – Caixas de Petri com raízes; 4 – Substrato.
6. Foram realizados 4 cestos, cada um correspondente a cada semana de contagem de gomos e seus estádios, para evitar a manipulação e possível desidratação das raízes.



Figura 18 - Cestos com caixas de Petri utilizados no protocolo 2.

O protocolo 2 teve em conta simular as condições em estufa, permitindo dar às raízes condições de luminosidade, picos de temperaturas superiores aos dos protocolos 1 e evitar a manipulação das raízes.

Para melhor entendimento da origem e desenvolvimento dos gomos observados, fotografaram-se os gomos em diferentes estádios utilizando uma lupa (Leica DCM8).

Posteriormente à obtenção de fotografias adequadas dos gomos, procedeu-se ao processo de fixação e desidratação através dos seguintes passos (também presentes no protocolo que consta no Anexo 1):

1. Coloca-se fixador, denominado de F.A.A. (1-formaldeído: 1-ácido acético glacial: 18-etanol 70%), num tubo de ensaio.
2. Coloca-se os gomos no seu interior.
3. Desidratou-se através de uma série progressiva de etanol.
4. Finalizada substitui-se para *histoclear* (durante 24h).

O processo indicado, teve como objetivo retirar os conteúdos de H₂O presentes no interior dos tecidos, preservando os mesmos, para que com o tempo, estes não se degradassem. O *histoclear* tem como função, permitir que a parafina entrasse nos tecidos radiculares para que quando se procedesse aos cortes histológicos, estes tecidos não quebrassem, ou não se encontrassem com bolsas de ar.

Já desidratados, os gomos foram colocados em copos de plástico com parafina no seu interior, numa câmara de aquecimento durante um dia, para que houvesse uma inclusão

adequada da parafina nos tecidos da raiz onde está inserido o gomo. Posteriormente a este período, procedeu-se à montagem das cassetes com as raízes selecionadas, em cima de uma placa de aquecimento para que se evitasse o arrefecimento da parafina e consequente solidificação. Finalizado este processo, colocaram-se as cassetes na câmara frigorífica durante um curto período (cerca de 20 min), para que a parafina solidifique e haja garantias da sua adequada consistência para a realização dos cortes histológicos.

Os cortes histológicos foram realizados com 10 μm de espessura, utilizando um micrótomo (Figura 19).



Figura 19 - Micrótomo utilizado para realização de cortes histológicos (Leica RM2255).

Previamente à realização dos cortes, aplicou-se levemente um adesivo (adesivo de Haupt's) a qual era necessária aquecer numa placa (Figura 20) para que os cortes aderissem adequadamente à lâmina.

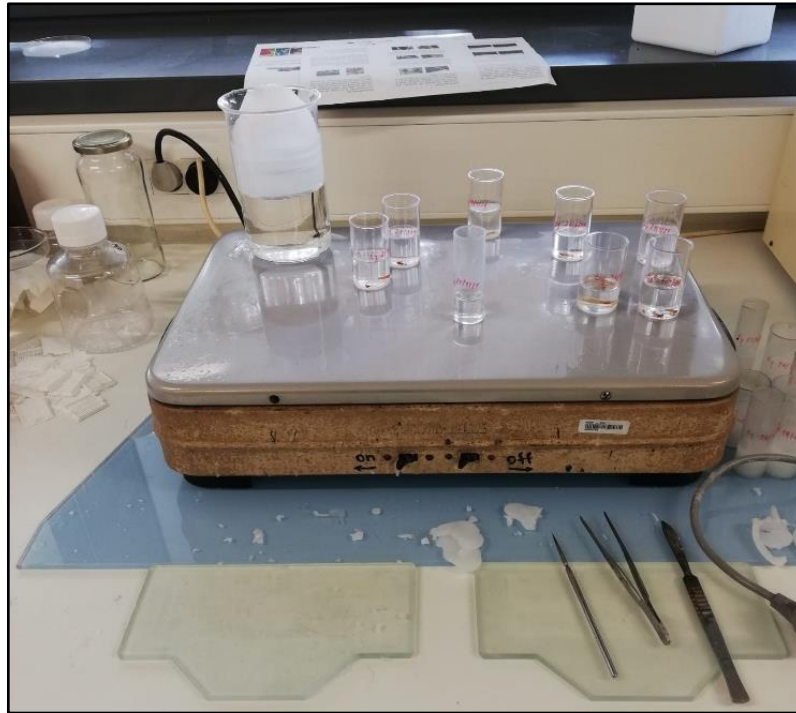


Figura 20 – Placa de aquecimento utilizada na preparação de lâminas utilizadas no ensaio 3.

Após este processo, pousou-se as lâminas em cima de uma placa de aquecimento, para a sua maior eficácia. Antes de realizar os cortes, colocou-se uma gota de água em cima da lâmina para que os cortes fiquem nítidos. Para todo este processo, foi necessário o manuseamento através de pinças e pincéis, devido à ínfima espessura dos tecidos. Após o preenchimento da lâmina, esta foi pousada em cima da placa de aquecimento, para que a água entre a cola e o corte seja evaporada e os cortes permaneçam distendidos. Após 30 min nestas condições, estas lâminas foram pousadas numa mesa, para o seu arrefecimento.

Posteriormente, usou-se um corante, o qual consistia numa mistura de astrablue com safranina (40 mg de safranina: 100 mg de astrablue em 100 de água: 2 ml ácido acético), que tinha a função de transmitir através da cor azul a existência atividade meristemática nos tecidos (efeito do astrablue). Por outro lado, encontrou-se a cor avermelhada, transmitida pela safranina, que nos transmite tecidos péricidos.

Finalizadas este processo, efetuou-se uma análise das lâminas com os cortes histológicos realizados e devidamente corados, tendo montado lâminas permanentes partir das lâminas selecionadas como esclarecedoras do caso em estudo. Estas lâminas foram observadas através de um microscópio, a partir do qual se obtiveram as fotografias (Leica DMC5400).

3.5. Tratamento dos dados

Foi utilizado o programa RStudio para realizar o tratamento estatístico. Realizou-se O teste F, com um nível de significância de $p < 0,05$. Foi realizada a anova a dois fatores, para verificar os comportamentos e a existência de interação entre os diferentes fatores utilizados. Complementando este tratamento, realizou-se o teste de Tukey, de forma a verificar que valores eram significativamente diferentes em fatores significativamente influentes.

4. Resultados e discussão

4.1. Ensaio 1 – Interação entre idade de plantação e número de horas de frio

Através do tratamento estatístico dos dados obtidos é possível verificar o comportamento dos sistemas radiculares através das cinco variáveis medidas, consoante os tratamentos a que estas foram submetidas (Quadro 3).

Quadro 3 - Média do número de rebentos, do peso do sistema radicular, do peso da touça, do peso dos lançamentos retirados previamente à lavagem dos sistemas radiculares, e peso da matéria seca do sistema radicular consoante a idade e tempo de permanência no frio para a cultivar Kweli.

Fator	Número Rebentos	Peso Sistema Radicular (g)	Peso Touça (g)	Peso Lançamentos Pré (g)	Peso Matéria Seca (g)
Idade					
16/03	22,7	435,3 B	89,9	69,7	67,8 B
06/04	42,1	689,0 A	112,0	130,3	101,6 A
27/04	24,1	527,6 B	102,9	100,4	79,2 B
SE	5,06	30,26	4,62	11,18	4,98
Tempo em Frio					
Controlo	13,8 B	473,7	104,7	140,0	78,2
15 dias	32,6 AB	548,9	93,8	96,6	79,0
30 dias	50,1 A	618,5	114,7	66,9	95,0
45 dias	22,0 AB	561,3	93,3	97,1	79,3
SE	5,06	30,26	4,62	11,18	4,98
Probabilidade do teste F					
Idade (I)	0,222	<0,001	0,145	0,084	0,014
Número de horas de Frio (F)	0,048	0,421	0,312	0,140	0,597
Interação (I x F)	0,141	0,837	0,785	0,242	0,937

SE - Erro padrão. A – Média significativamente mais alta que B; AB – Média não significativamente diferente de A ou B – Média significativamente mais baixa que média A segundo o teste de Tukey para $\alpha=0,05$

Neste ensaio, não foi evidenciado a existência de uma interação entre os fatores idade e tempo em frio ($p > 0,05$) relativamente à variável principal, ou seja, o número de rebentos emitidos. Desta forma, passou-se a tratar os fatores de forma independente.

É importante de salientar que todas as correlações que se realizaram entre as variáveis não mostraram nenhuma significância ($R^2 < 0,50$) entre as variáveis obtidas.

4.1.1. Número de rebentos

O fator que mais teve influência na emissão de lançamentos de raiz foi o fator tempo em frio, com $p < 0,05$. Verifica-se que o tratamento de controlo (sem frio), foi o que obteve um menor número de rebentos, porém, foi o que evidenciava um maior peso de rebentos já emergidos antes da lavagem do sistema radicular, o que vai ao encontro aos resultados de Schier (1972) que concluíram, que quanto maior o número de rebentos emergidos, menor o número de gomos de raiz. Para além deste comportamento ter sido notório nos resultados, ao longo do ensaio, observou-se que os últimos lançamentos emergidos apresentavam um diâmetro muito mais fino que os primeiros. Verificou-se que os sistemas radiculares submetidos a cerca de 5°C durante 45 dias, apresentaram uma média de número de rebentos emergidos inferior aos sistemas radiculares submetidos à mesma temperatura durante 15 dias (com médias de 22 e 32 rebentos, respetivamente) (Figura 21).

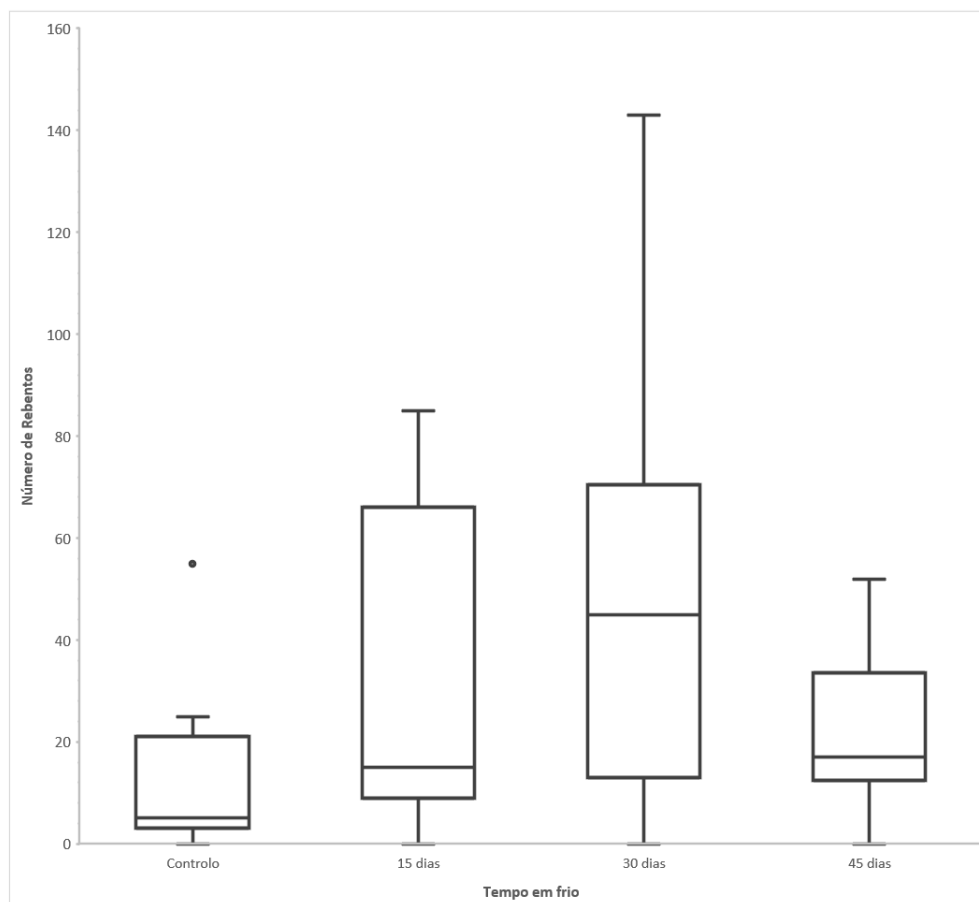


Figura 21 - Diagrama de extremos e quartis de número de rebentos do fator tempo em frio, em framboesa da variedade Kweli.

O tratamento mais eficaz foi submeter os sistemas radiculares durante 30 dias, a temperaturas entre os 4 e 6°C. Este tratamento apresentou uma média de valores nas 3 idades utilizadas, superior a todos os outros tratamentos. Isto leva a dizer que o tratamento de 45 dias, na multiplicação vegetativa de plantas de framboesa na variedade Kweli, acaba por ser benéfico, devido à média ser superior à de controlo, porém, de todos os tratamentos, foi o que apresentou uma média de valores mais baixa. Esta afirmação é justificada pelo facto de mesmo com um erro-padrão de 5,058 a média de valores do tratamento de 15 dias continua a ser igual à de 45 dias. Isto permite afirmar que o fator frio é necessário para que se consiga aumentar a propagação vegetativa de plantas de framboesa, tal como Carew et al. (2000) e Sønsteby & Heide (2008; 2009) afirmaram. Não é possível afirmar que 30 dias seja o tempo ideal para maximizar o efeito deste fator (a cerca 5 °C), mas será consideravelmente aproximado, devido à diferença entre o tratamento de 30 dias e os de 15 e 45 dias.

O fator idade apresenta um p-value de 0,222, relativamente à variável resposta (número de rebentos), mostrando que não existe influência significativa. O maior valor apresentado foi o de 06/04, com uma média de 42 rebentos, enquanto que o valor mais baixo foi de 16/03 com 22 rebentos. A média de 27/04 foi de 24 rebentos, aproximando-se mais da idade mais velha, ou seja 342 DAP, do que a com 322 DAP (Figura 22).

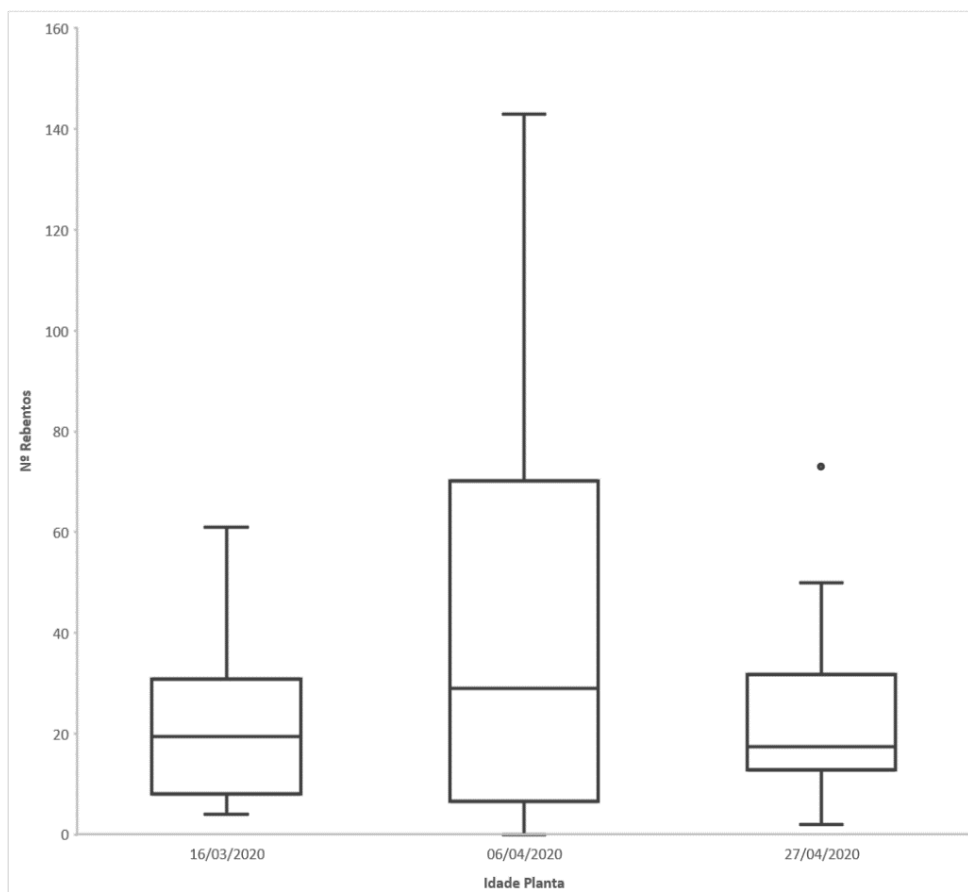


Figura 22 – Diagrama de extremos e quartis do número de rebentos do fator idade de plantação, em framboesa da variedade Kweli.

Não deixa de ser necessário salientar que apesar da idade não ter uma influência direta no número de rebentos obtidos, este fator é preponderante no peso de raízes obtido no volume de sete litros de vaso. Este peso, como já foi mostrado anteriormente, não teve um efeito significativo na obtenção de rebentos, indo assim ao encontro do que foi observado por Tew (1970) e Schier & Zasada (1973), os quais não conseguiram encontrar nenhuma relação entre o peso do sistema radicular e o número de rebentos obtidos.

Após a análise, torna-se necessário verificar se algum destes efeitos teve influência no enraizamento de rebentos (quadro 4).

Quadro 4 - Médias, Erro padrão e probabilidade de teste F de variáveis de enraizamento, consoante os fatores idade e tempo de permanência em frio.

Fator	Rebentos Enraizados	Taxa de Enraizamento
Idade		
16/03	17,8	0,84
06/04	36,8	0,88
27/04	21,7	0,90
<i>SE</i>	4,51	0,03
Tempo em Frio		
Controlo	10,6 B	0,84
15 dias	26,6 AB	0,89
30 dias	45,2 A	0,89
45 dias	19,3 AB	0,86
<i>SE</i>	4,51	0,03
<i>Idade</i>	0,197	0,702
<i>Número de horas de Frio</i>	0,038	0,947

SE - Erro padrão. A – Média significativamente mais alta que B; AB – Média não significativamente diferente de A ou B – Média significativamente mais baixa que média A segundo o teste de Tukey para $\alpha=0,05$

Verificou-se que os fatores idade e tempo em frio não interferem na taxa de enraizamento. Ambos os fatores apresentaram uma probabilidade de teste F superior a 0,05, transmitindo-se numa influência não significativa. Observou-se que todos os tratamentos tiveram uma taxa de enraizamento superior a 80%. Numa perspetiva do fator idade, a idade 27/04 foi a idade que teve maior taxa de enraizamento (90%), enquanto que a idade 16/03 foi a idade que se refletiu numa menor taxa, com 84%.

No fator tempo em frio, o tratamento que permitiu obter a menor taxa de enraizamento foi o tratamento de controlo (com 84%). Por outro lado, os tratamentos de 15 e 30 dias dos vasos de sete litros obtiveram resultados muito similares (cerca de 89%).

4.1.2. Peso radicular

Relativamente ao peso do sistema radicular, o fator tempo em frio, não exerceu influência, tendo um p-value de 0,421 (figura 23).

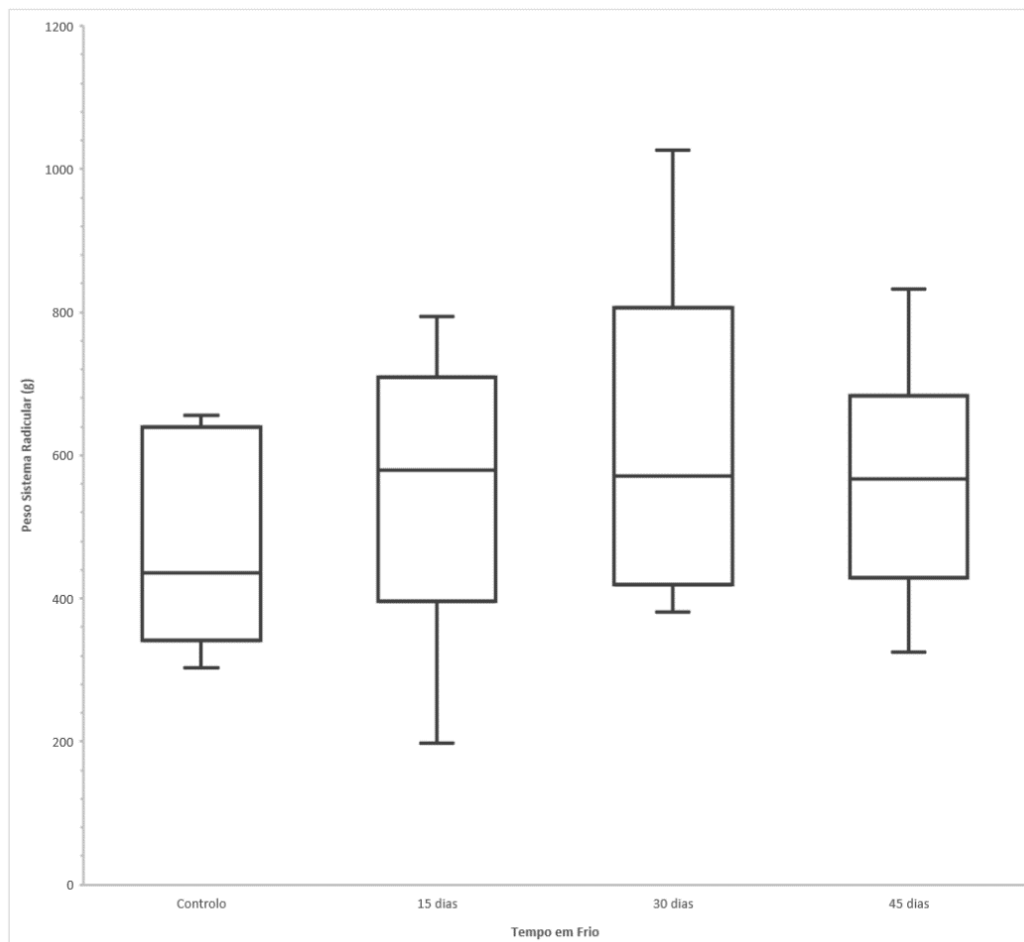


Figura 23 – Diagrama de extremos e quartis do peso de sistema radicular (em gramas), do fator número de horas de frio, em framboesa da variedade Kweli.

Os sistemas radiculares que apresentaram menor média de peso foram os de tratamento de controlo (474 g), enquanto o tratamento que apresentou maior peso radicular foi o de 30 dias (619 g).

O fator idade apresentou uma influência significativa na variável “Peso de sistema radicular”, através de uma probabilidade de teste $F < 0,001$. A idade de 322 DAP continha um peso radicular na amostra maior, comparando com as outras idades. Esta apresentou uma média de 689 g, enquanto que a idade 27/04 apresentou uma média de 528 g e 16/03 de 435 g (figura 24).

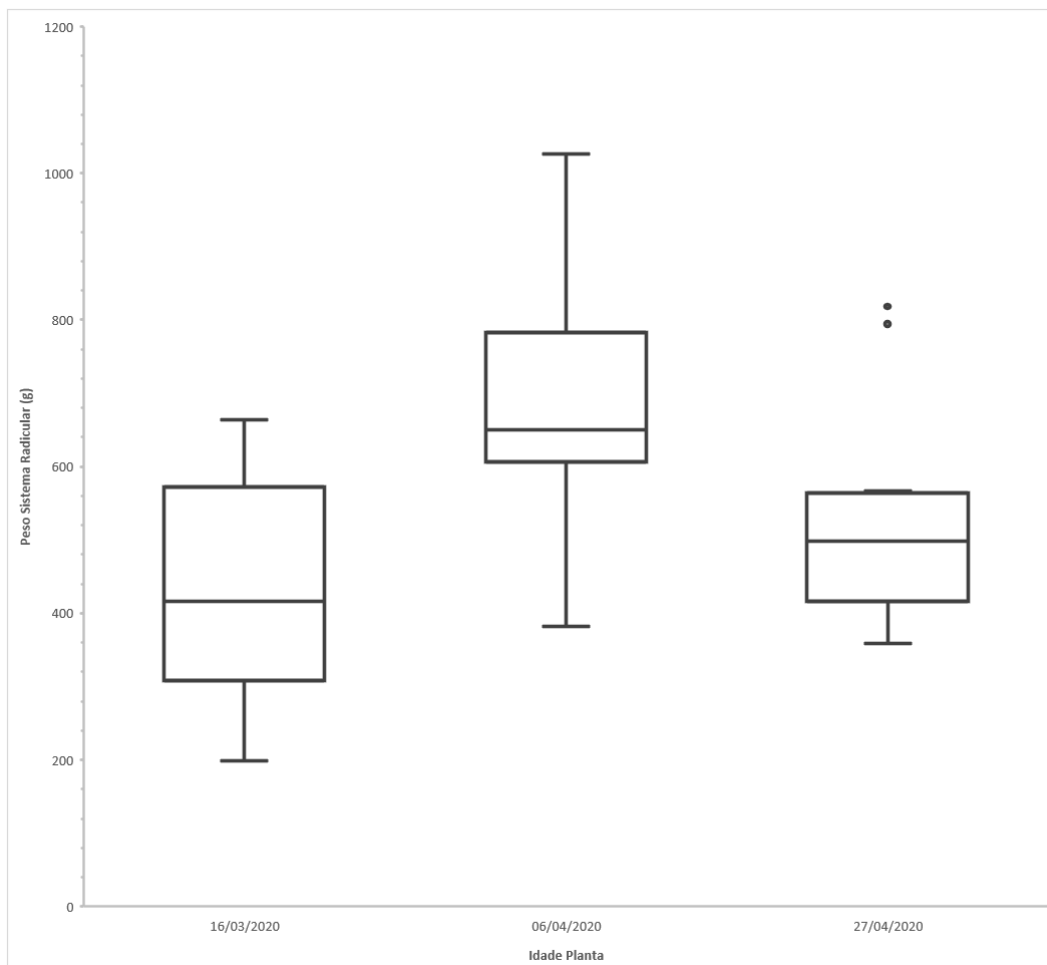


Figura 24 – Diagrama de extremos e quartis do peso do sistema radicular em gramas do fator idade de plantação, em framboesa da variedade Kweili.

4.1.3. Peso de lançamentos emergidos previamente à lavagem do sistema radicular

Outra variável quantificada foi o peso de lançamentos que se encontravam emergidos previamente à lavagem dos sistemas radiculares. Nesta variável, o fator frio, não foi significativo ($p > 0,05$) e o tratamento que apresentou maior média de valores foi o tratamento de controlo (140 g), enquanto que apresentou menor média de valores, foi o de 30 dias (67 g) (Figura 25).

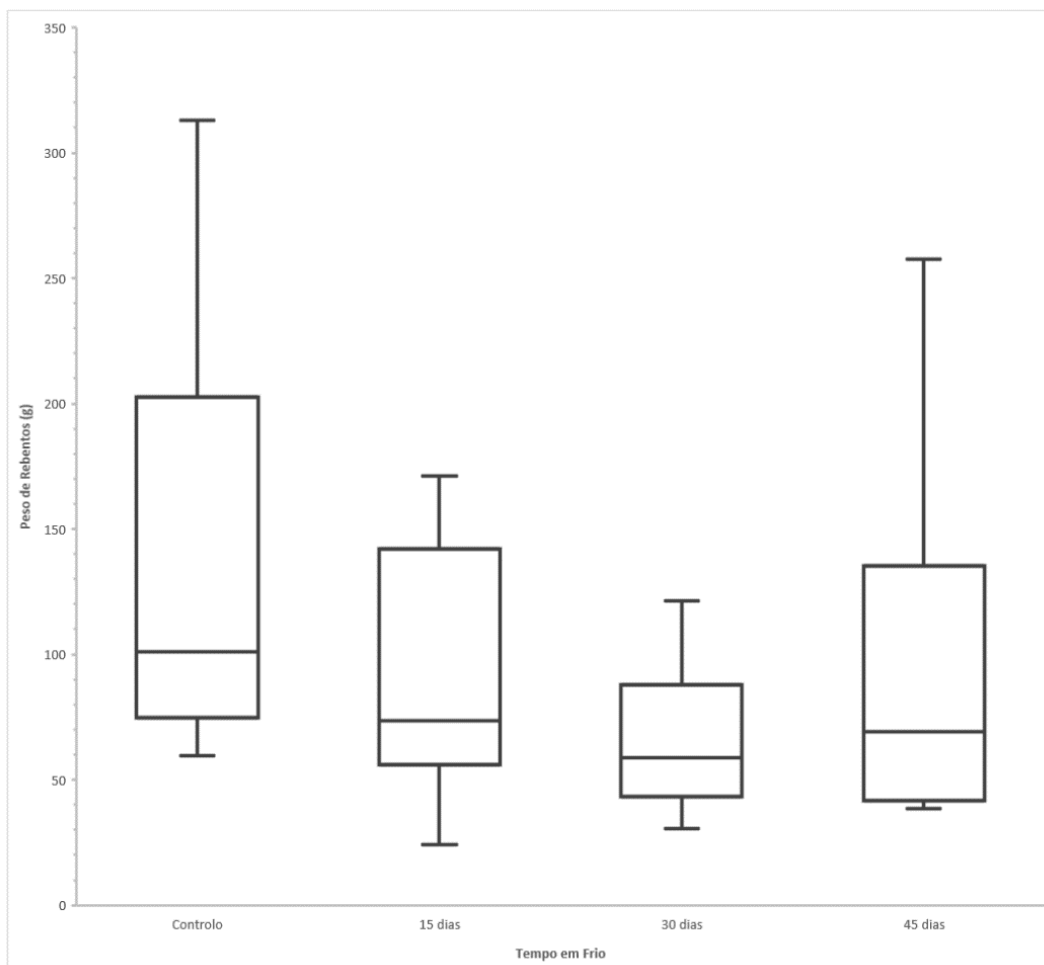


Figura 25 – Diagrama de extremos e quartis do peso em gramas de rebentos emergidos previamente à lavagem do sistema radicular, do fator número de horas de frio, em framboesa da variedade Kweli.

Após se observar os valores obtidos, estes dizem-nos que quanto maior o peso de rebentos emergidos antes da lavagem dos sistemas radiculares, menor é o número de rebentos obtido durante os 60 dias de ensaio (figura 26).

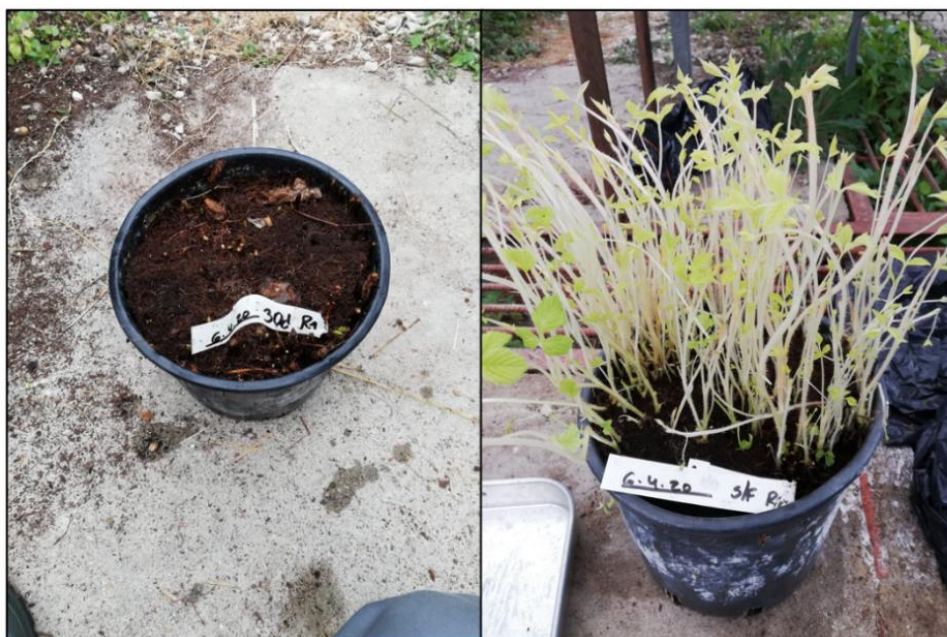


Figura 26 - Diferença entre rebentos emergidos previamente à lavagem dos sistemas radiculares de idade 06/04, de tratamento em frio de 30 dias (imagem da esquerda) e tratamento sem frio (imagem da direita).

O facto de temperaturas baixas serem necessárias para a quebra de dormência dos gomos, temperaturas altas apresentam ser também indutoras de abrolhamento dos gomos após a quebra da dormência, tal como Brierley (1930) afirmou, que a dormência é retida se as temperaturas continuam abaixo do limiar de crescimento.

A idade de 06/04 (322 DAP) foi a que apresentou maior média de peso, enquanto que a idade 16/03 (342 DAP) foi a que apresentou menor média.

Apesar de a diferença entre as médias de 16/03 e 27/04 ser de cerca de 30g, esta traduziu-se numa diferença de apenas 2 rebentos entre estas idades (22,7 e 24,1 respetivamente). O efeito da idade nesta variável não foi significativo, apresentado um p-value de 0,08. Estes valores encontram-se apresentados sob forma de gráfico na figura 27.

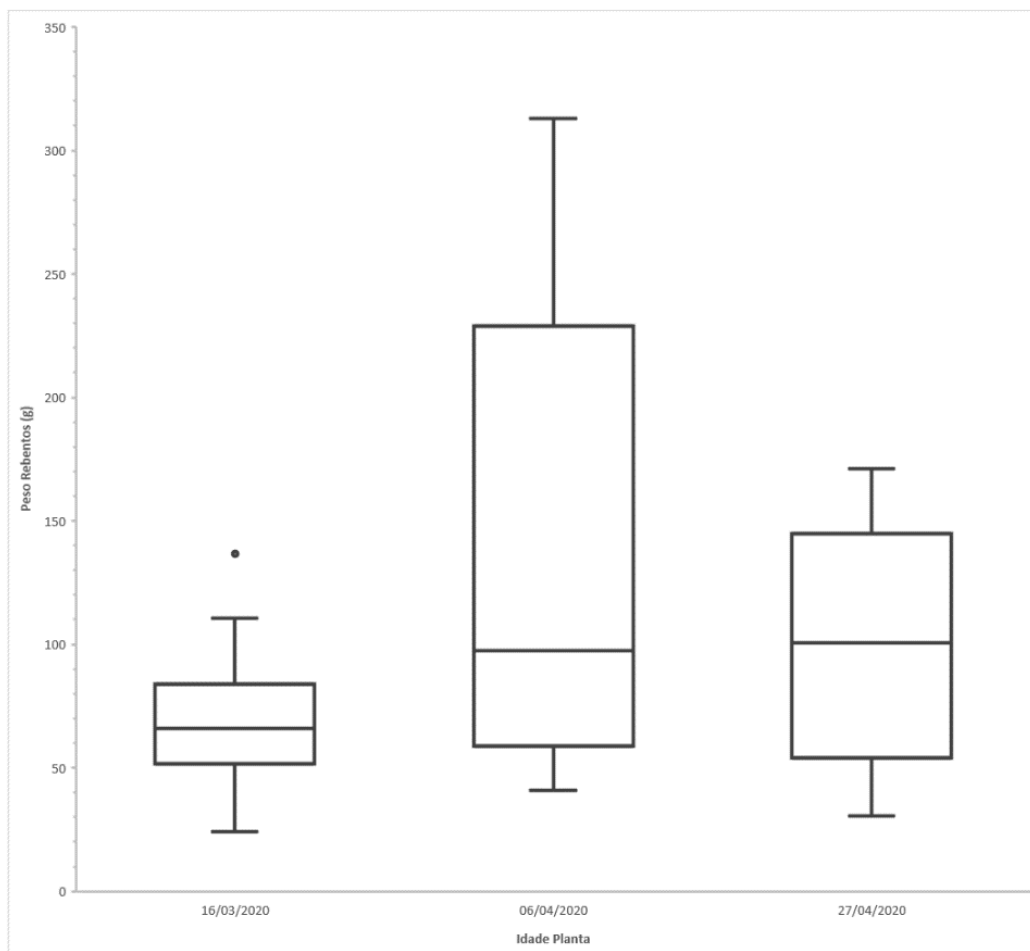


Figura 27 – Diagrama de extremos e quartis do peso em gramas de rebentos emergidos previamente à lavagem do sistema radicular, do fator idade de plantação, em framboesa da variedade Kweli.

É importante ter em mente que os lançamentos se comportam como sink em fases iniciais, tornando-se autónomas mais tarde. Posteriormente ao corte dos rebentos da raiz, o lançamento encontra-se ainda branco, o que nos permite sugerir que toda aquela zona pode conter características meristemáticas, donde surgem as primeiras raízes para que possam sobreviver de forma autónoma. Por outro lado, esse rebento só deverá ser cortado, quando este tiver três folhas verdadeiras, tendo assim uma área foliar capaz de realizar fotossíntese e acumular reservas no sistema radicular.

Os rebentos contabilizados nesta variável, são rebentos que já tinham sido emitidos, e já se encontravam em estados mais avançados para que se pudesse pôr em igualdade de condições todos os sistemas radiculares. Desta forma, estes rebentos foram cortados, mas contabilizou-se o peso destes rebentos para que se pudesse verificar a possibilidade de existência de uma relação entre este peso de rebentos e o número de rebentos que iriam emergir.

4.1.4. Peso da touça

Relativamente ao peso da touça, o fator idade não teve uma influência significativa, sendo que se observou que a idade 06/04 foi a que apresentou maior peso (cerca de 112 g) e a idade de 16/03 a que apresentou menor média de peso de touça (cerca de 89 g). Verifica-se que esta variável tem o mesmo comportamento que o peso de rebentos emergidos antes da lavagem dos sistemas radiculares, isto é, tendo a idade 27/04 um valor aproximado da idade 06/04, não se traduzindo numa grande diferença entre o número de rebentos obtido. Através da figura 28, pode-se verificar o comportamento dos valores desta variável, obtidos neste ensaio.

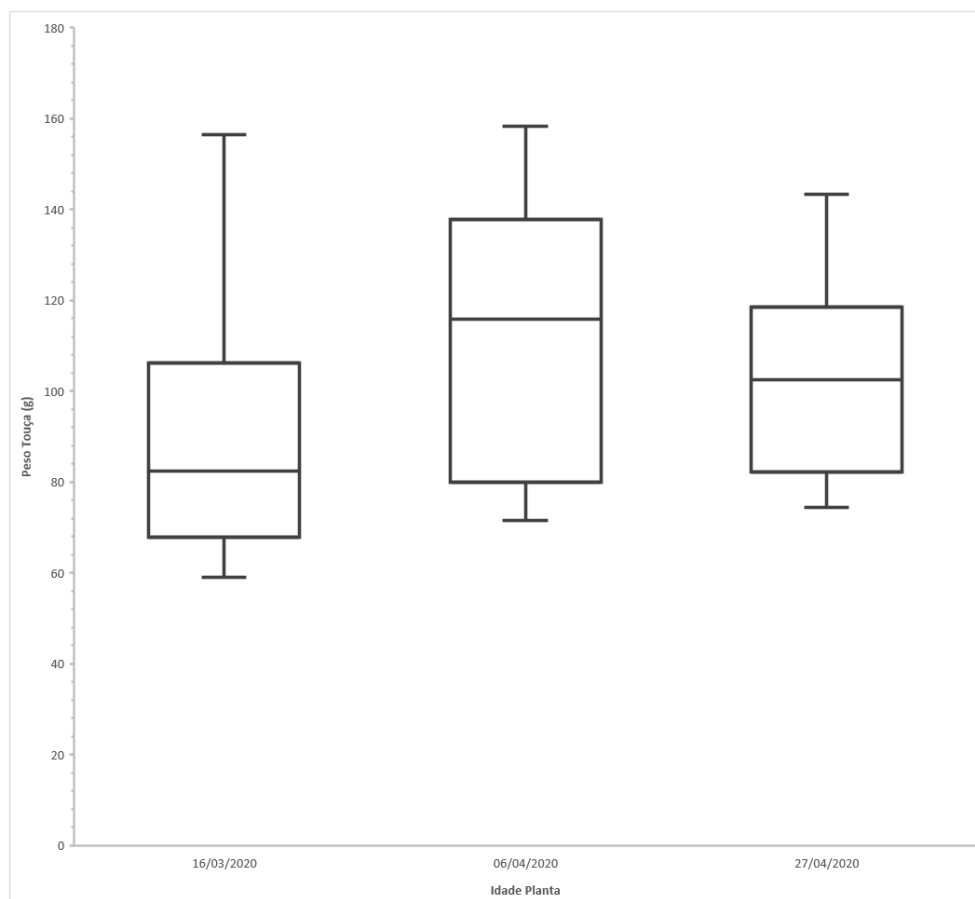


Figura 28 – Diagrama de extremos e quartis do peso em gramas das touças no fator idade na variedade Kweli.

Esta variável não mostrou ter uma relação com o número de rebentos obtidos, nem com o peso de sistema radicular ($R^2 < 0,50$), o que nos permite sugerir que os assimilados ao longo do ciclo cultural, são fornecidos predominantemente para o sistema radicular e para a parte

aérea, não investindo mais que o necessário na parte estrutural acima do nível do solo, visto que não existe uma proporcionalidade entre estas duas variáveis.

4.2. Ensaio 2 – Interação entre família e genótipo

Neste ensaio, verificou-se que relativamente à variável resposta deste estudo, os fatores família e genótipo apresentaram interação, passando assim a não poder se visualizar este ensaio com dois fatores independentes. A existência de interação neste ensaio, diz-nos que genótipos dentro da mesma família, apresentam comportamentos completamente diferentes. Os dados obtidos neste ensaio encontram-se apresentados de seguida sob a forma de quadro (Quadro 5).

Quadro 5 - Médias, Erro padrão e probabilidade de teste F de variáveis resposta, consoante os fatores família, genótipo e sua interação.

Tratamento		Número de Rebentos	Peso Matéria Seca (g)
Família	Genótipo		
1F	1F4	3,7 B	96,9 A
	1F15	2,0 B	72,3 AB
	1F65	0,7 B	74,2 AB
	1F81	12,7 AB	62,7 AB
9.2F	9.2F6	22,0 AB	66,8 AB
	9.2F21	3,3 B	95,7 A
	9.2F34	0,0 B	27,8 B
	9.2F44	1,0 B	54,8 AB
10F	10F44	31,7 A	49,7 AB
	10F50	20,7 AB	70,6 AB
	10F58	16,7 AB	93,1 A
	10F66	1,0 B	73,9 AB
<i>SE</i>		2,13	4,16
<i>Probabilidade do teste F</i>			
<i>Família (F)</i>		0,004	0,150
<i>Genótipo (G)</i>		0,009	0,296
<i>Interação (F × G)</i>		0,018	0,002

SE - Erro padrão. A – Média significativamente mais alta que B; AB – Média não significativamente diferente de A ou B – Média significativamente mais baixa que média A segundo o teste de Tukey para $\alpha=0,05$

Verificou-se que neste ensaio, não só existiu interação dos dois fatores existentes, mas também existiu um efeito significativo por parte de cada um dos fatores. Por outras palavras, genótipos apresentaram variâncias muito grandes entre si e famílias apresentaram o mesmo

comportamento. É ainda importante de salientar que não se verificou nenhuma correlação significativa ($R^2 < 0,50$) entre as variáveis obtidas.

4.2.1. Número de rebentos

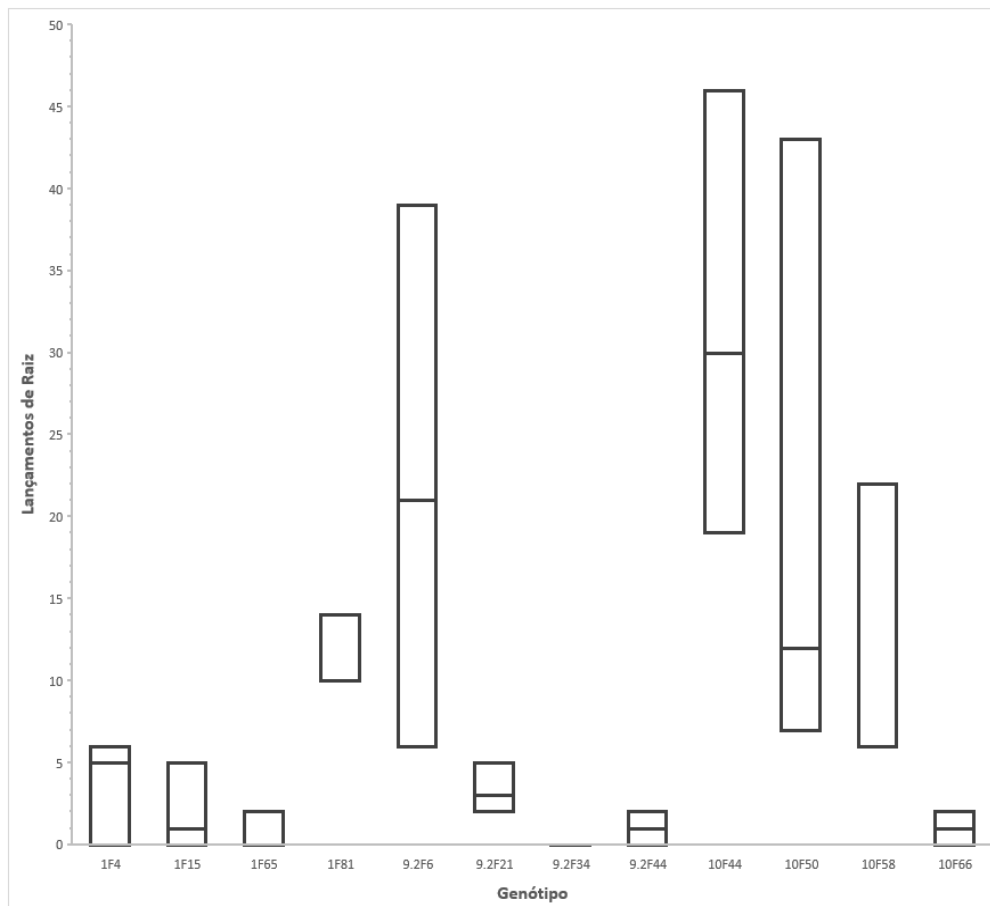


Figura 29 – Diagrama de extremos e quartis do número de lançamentos de raiz em cada genótipo, em framboesa.

O genótipo 10F44 foi o que apresentou valores médios mais altos (cerca de 31 lançamentos), enquanto que o genótipo que apresentou valores mais baixos, não tendo apresentado qualquer emissão de lançamentos, foi o 9.2F34 (figura 29). Desta forma, podemos verificar que existe uma diferença máxima de 31 rebentos entre o valor superior e inferior deste ensaio.

Para além deste aspeto, podemos observar que na família 10F, na qual se enquadra o genótipo com maior emissão de rebentos neste ensaio, encontra-se também o genótipo 10F66, que apresentou uma média de 1 lançamento.

Relativamente ao enraizamento dos rebentos, as médias dos enraizamentos encontram-se apresentados no quadro 6, bem como a taxa de enraizamento.

Quadro 6 - Médias de número de rebentos, número de rebentos enraizados e taxa de enraizamento, consoante os fatores família, genótipo e sua interação.

Tratamento		Número de Rebentos	Número de Rebentos Enraizados	Taxa de Enraizamento
Família	Genótipo			
1F	1F4	3,7 B	2,3 AB	0,45
	1F15	2,0 B	1,7 B	0,50
	1F65	0,7 B	0,0 B	0,00
	1F81	12,7 AB	8,7 AB	0,70
9.2F	9.2F6	22,0 AB	17,7 A	0,75
	9.2F21	3,3 B	2,7 AB	0,87
	9.2F34	0,0 B	0,0 B	0,00
	9.2F44	1,0 B	1,0 B	1,00
10F	10F44	31,7 A	12,0 AB	0,32
	10F50	20,7 AB	8,0 AB	0,49
	10F58	16,7 AB	9,0 AB	0,53
	10F66	1,0 B	0,3 B	0,50
<i>SE</i>		2,13	1,22	0,07
<i>Probabilidade do teste F</i>				
<i>Família (F)</i>		0,004	0,202	0,046
<i>Genótipo (G)</i>		0,009	0,035	0,526
<i>Interação (F × G)</i>		0,018	0,018	0,763

SE - Erro padrão. A – Média significativamente mais alta que B; AB – Média não significativamente diferente de A ou B – Média significativamente mais baixa que média A segundo o teste de Tukey para $\alpha=0,05$

O fator família não teve influência significativa no número de rebentos enraizados, ao contrário do fator genótipo (quadro 6). Por outro lado, estes fatores tiveram consequências contrárias na influência na taxa de enraizamento, isto é, na taxa de enraizamento, apenas o fator família influenciou significativamente esta variável. Isto permite-nos supor que o fator família tem um papel importante no enraizamento destes rebentos.

4.2.2. Peso da matéria seca do sistema radicular

Por outro lado, tanto o fator família como o fator genótipo não tiveram influência significativa nos valores de peso de matéria seca do sistema radicular, porém, na interação observou-se essa influência significativa, apresentando uma probabilidade do teste F de 0,002.

Estes valores permitem-nos dizer, que se encontra um padrão de valores entre famílias e que a diferença entre genótipos não é suficientemente significativa para dizer que estes são diferentes, contudo, dentro da mesma família existe diferenças muito notórias que nos possibilitam afirmar que são significativamente diferentes do padrão da família. Das variâncias mais impactantes para este resultado, foi a diferença entre médias na família 9.2F, na qual o genótipo 9.2F21 apresenta uma média de 93 g de peso de matéria seca, enquanto que o segundo maior valor se encontra nas 66 g (pertencentes ao genótipo 9.2F6), chegando a ter uma diferença de cerca de 65 g do genótipo 9.2F34. Este tipo de comportamento pode ser verificado através do quadro 5 e observado com o auxílio da figura 30.

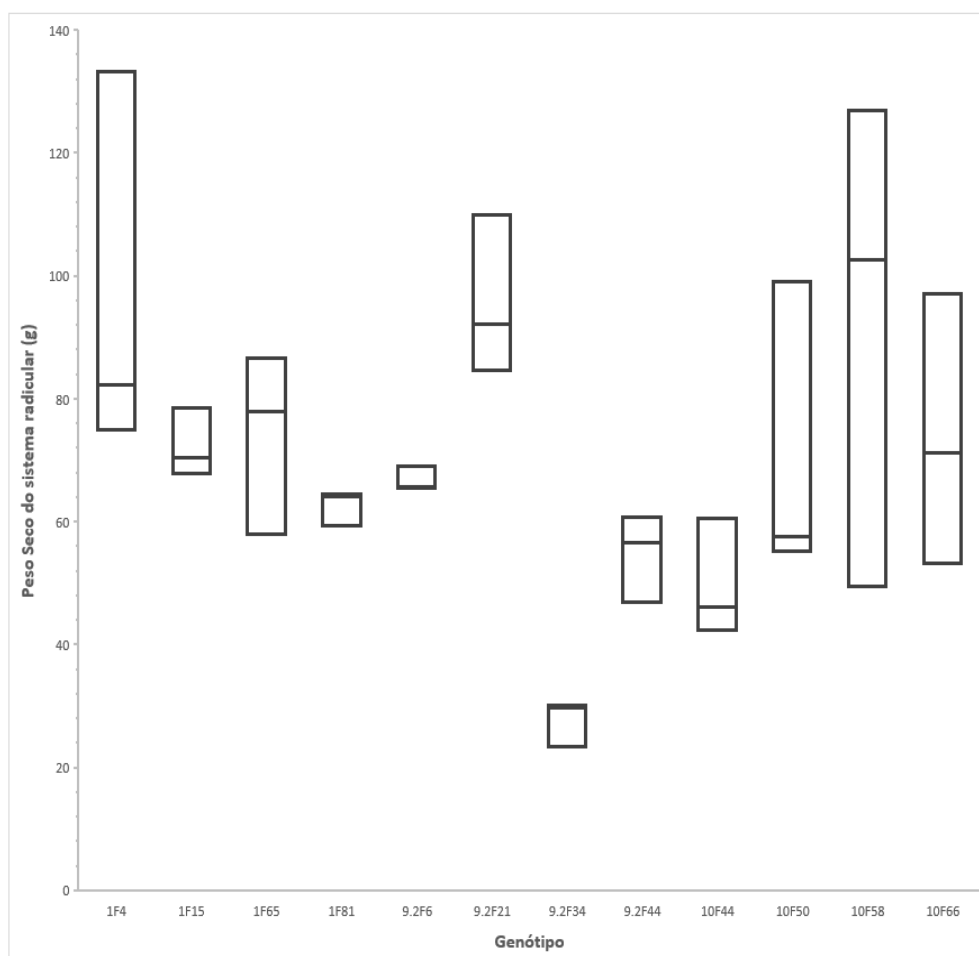


Figura 30 – Diagrama de extremos e quartis do peso da matéria seca do sistema radicular (em gramas) em cada genótipo, em framboesa.

4.3. Ensaio 3 – Morfologia e anatomia dos gomos radiculares

Os resultados obtidos através dos protocolos usados apenas nos permitem sugerir hipóteses. A aplicação do protocolo 1 não mostrou nenhuma evolução nos gomos, facto que nos permite colocar a hipótese de que a manipulação, a falta de luminosidade ou picos de temperatura possam ser significativamente influentes na emissão de lançamentos. Assim, foi necessário realizar um segundo protocolo que nos permitiu obter imagens de gomos no estágio 4. O protocolo 2 permitiu a partir da segunda semana, lançamentos de raiz com algum alongamento, no entanto, não nos permitiu obter fotografias do seu corte histológico devido à sua fragilidade na manipulação. Isto vai de encontro ao referido por Johansson & Lundh (1988), a temperatura e luminosidade são significativamente influentes no abrolhamento de gomos de raiz. Porém, neste estudo, estes resultados não nos permitem afirmar se a temperatura constante de 20 °C será suficiente para o abrolhamento destes gomos, visto que os gomos a temperaturas constantes de 20 °C não mostraram desenvolvimento.

Devido à impossibilidade de na altura se continuar com a determinação destes fatores. é sugerido, numa perspetiva futura, realizar o protocolo 1, sem a envolvência das placas de Petri com papel de alumínio, permitindo a exposição dos gomos à luminosidade, averiguando a ausência ou existência de características fototrópicas.

Através da utilização da lupa, conseguiu-se recolher imagens de todos os estádios morfológicos dos gomos. A partir das imagens obtidas, foi construída uma escala, para se conseguir enquadrar o estado de desenvolvimento dos gomos. Os gomos foram classificados entre estágio zero e estágio quatro, tal como é demonstrado na figura 31.



Figura 31 - Escala morfológica de gomos de raízes adventícias em framboesa, em que: Imagem A – Gomo no estágio 0 (verifica-se uma pequena protuberância) ; Imagem B – Gomo no estágio 1 (observa-se um crescimento da protuberância) ; Imagem C – Gomo no estágio 2 (já se observa um intumescimento); Imagem D – Gomo no estágio 3 (verifica-se a existência de brácteas); Imagem E – Gomo no estágio 4 (aparecimento do lançamento de raiz).

Através das imagens apresentadas, podemos verificar que a classificação utilizada, conservou estruturas, as quais podem ser diferenciadas a olho nu.

No estágio 0 (figura 31A), encontra-se evidente que existe uma diferenciação das estruturas celulares na periferia da raiz, apresentando heterogeneidade na epiderme. No estágio 1 (figura 31B), observa-se um intumescimento na estrutura da epiderme, isto é, visualiza-se uma saliência na zona do gomo. No estágio 2 (figura 31C), verifica-se o rompimento da epiderme, tornando-se visível um meristema apical do gomo. No estágio 3 (figura 31D), já se encontram formadas brácteas em torno do meristema apical do gomo. Por fim no estágio 4 (figura 31E), observa-se o alongamento do gomo, libertando brácteas ao longo deste processo.

Ao longo da visualização de raízes, verificou-se que existia uma maior existência de gomos em curvas, mudanças de direção repentinas e locais de produção de radículas, tal como

Christensen (1947) afirmou. Também se observou que em raízes em que a incidência dos gomos era pequena, os gomos existentes apresentavam-se seguidos, em grupos de três ou quatro gomos. Não é possível afirmar a razão deste comportamento, mas sugere-se que são zonas em que as condições para a viabilidade de abrolhamento destes gomos sejam maiores, tal como maior acumulação de reservas, visto que estas são essenciais para a emissão de novos lançamentos.

Através da figura 31, pode-se verificar que ao longo do alongamento do lançamento, deu-se também a iniciação foliar, isto é, ao longo do alongamento do lançamento vê-se a libertação de folhas, porém, estas ainda não captam luminosidade, sentindo assim a necessidade de continuar o seu alongamento até a captação de luminosidade por parte da primeira folha e estabelecerem a sua área fotossintética, tal como foi referido por Hudson (1958).

Ao longo dos ensaios 1 (idade x frio) e 2 (família x genótipo), verificou-se que em períodos de céu nublado e conseqüentemente menor temperatura no interior da estufa, existiu uma menor emissão de lançamentos, o que vai ao encontro ao que afirmou Lang et al. (1985), que a dormência é afetada pela endodormência, mas também pela paradormência e pela ecodormência, sendo que White et al. (1998) afirma que estes podem atuar em combinação e ter um efeito acumulativo no crescimento de gomos, nomeadamente no final de Inverno.

Utilizando o microscópio, obtiveram-se fotografias dos cortes histológicos dos gomos nos estádios apresentados acima, exceto o estádio 4, no qual se torna evidente que a partir desse estádio, o gomo já se encontra em fases finais. As fotografias encontram-se na figura 32.

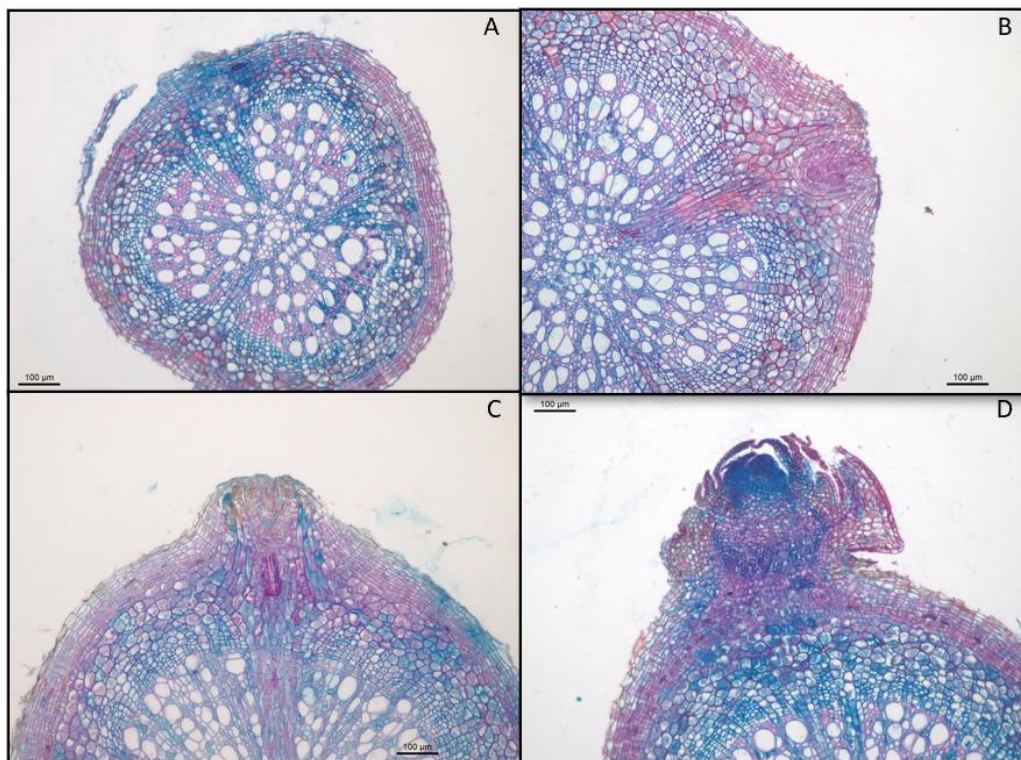


Figura 32 – Escala histológica de gomos de raízes adventícias em framboesa, em que: Imagem A – Gomo no estágio 0 (verifica-se alguma atividade celular na zona periférica da raiz) ; Imagem B – Gomo no estágio 1 (observa-se atividade celular, surgindo uma maior densidade de células na zona central do intumescimento) ; Imagem C – Gomo no estágio 2 (já se observa alguma atividade meristemática no gomo); Imagem D – Gomo no estágio 3 (verifica-se a existência de um meristema apical e de meristemas foliares laterais).

Na figura 32, pode-se observar através da imagem A, que no estágio 0, verifica-se a existência de uma atividade celular na endoderme, córtex e epiderme. Este acontecimento dá indício de possibilidade de desenvolvimento de gomo vegetativo. Na imagem B, já se pode verificar a divisão celular através de mitoses, criando um intumescimento na epiderme relativamente à superfície do resto da raiz. A imagem C permite observar a atividade meristemática na zona do gomo. Observa-se que nestes dois últimos estádios, é necessário o alongamento de células, para a alimentação e desenvolvimento do gomo a partir das reservas. Na imagem D, já se verifica a existência de um meristema apical, com primórdios foliares laterais, sendo que já não se verifica o alongamento das células, tendo uma zona de separação bem definida entre a raiz progenitora e o gomo.

Ao longo da realização deste ensaio, verificou-se que em algumas raízes, se observava a existência de dois gomos parecidos, mas com epiderme de tonalidades diferentes: gomo com epiderme clara e gomo com epiderme escura.

Começou-se por se colocar a hipótese de um deles não ser um gomo vegetativo, pelo qual se realizou cortes histológicos para a verificação da origem destes gomos. Posteriormente

a todo esse processo, e a obtenção das fotografias dos dois tipos de gomos, verificou-se que um deles era um gomo radicular e o outro vegetativo (Figura 33).

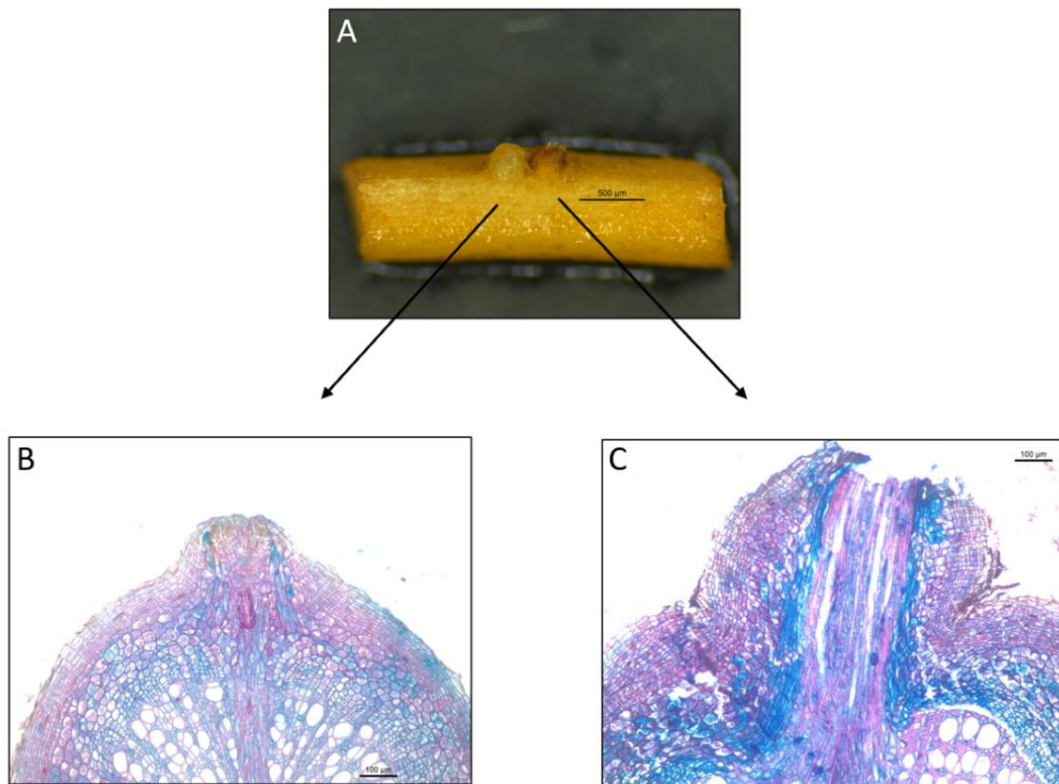


Figura 33 - Diferenciação morfológica e anatômica dos gomos com epiderme clara e escura. (Imagem A - Diferenciação morfológica de gomos com epiderme clara e escura; Imagem B - Estrutura anatômica do gomo com epiderme clara; Imagem C - Estrutura anatômica do gomo com epiderme escura.

Tal como se pode observar neste caso, existe uma diferença de tonalidade entre estes dois tipos de gomos, porém, tal pode não acontecer noutros genótipos devido a diferentes estados de suberização da epiderme ou tonalidade da raiz. Apesar desta tonalidade, pode-se verificar que até ao estágio 1, estes gomos são idênticos a olho nu, sendo apenas distinguível através de cortes histológicos. Tal como Torrey (1976) refere, lançamentos laterais nos troncos são originados a partir de tecidos periféricos, enquanto que raízes laterais começam a se formar no periciclo, tal se verifica nas imagens B e C da Figura 33. O gomo radicular continha uma formação de feixes vasculares, já definidos, ligados ao feixe vascular da raiz principal, enquanto que o alongamento celular que verificamos no gomo vegetativo trata-se de uma organização celular. Desta forma, aconselha-se a atribuir a contagem de gomos vegetativos a partir do estágio 2, devido à incerteza na morfologia a olho nu dos outros dois estádios iniciais.

Como perspectiva futura, para analisar proporções de formação de gomos vegetativos relativamente a gomos radiculares, poderá se contabilizar os gomos no estágio 0 e 1, analisando durante dias ou semanas, em laboratório, que quantidade destes gomos dá origem a lançamentos ou a raízes adventícias.

5. Conclusão

Podemos assim concluir que a idade ideal para obtenção de gomos de raiz é nos 322 DAP, o que significa uma data de plantação no início de abril. O tratamento de frio (a 5 °C) mais eficaz na propagação vegetativa através deste método foi 30 dias em câmara frigorífica. É de salientar que estes sistemas radiculares apenas têm um ano de idade, não se podendo afirmar que estes fatores possam surtir o mesmo efeito em raízes com 2 ou mais anos de idade.

Relativamente ao ensaio dois, apesar de existir uma grande variabilidade entre genótipos e entre famílias, a família não pode ser utilizada como único critério de escolha, para seleção de genótipos num programa de melhoramento de propagação vegetativa através de gomos de raiz em framboesa vermelha. Para além deste aspeto, é necessário ter em conta, que o somatório de temperaturas foi igual em todos os genótipos, o que pode ter sido um fator limitante na obtenção de lançamentos de raiz.

Focando-se nos gomos, mais especificamente nos seus estádios iniciais, não é possível distinguir o tipo de gomo (vegetativo ou radicular), através de observações morfológicas. Raízes de diferentes idades ou variedades podem ter diferentes tonalidades devido ao estado de suberização, confundindo essa classificação. Assim, a observação morfológica das raízes em estádios iniciais não nos permite afirmar se um dado genótipo irá produzir muitos lançamentos de raiz. Para tal terá que se recorrer à observação apenas de gomos no estádio 2 ou superior.

Espera-se em estudos futuros, conseguir obter um método de classificação de viabilidade de multiplicação de genótipos. Este método deverá ser predominantemente desenvolvido utilizando câmaras de crescimento, permitindo a incidência da luminosidade nas raízes utilizadas. Por outro lado, deverá realizar-se um estudo de genótipos com diferentes tratamentos de frio, podendo visualizar se existe diferenças na sua resposta através da emissão de lançamentos, observando também se existe um padrão de comportamento consoante a família. Seria ainda interessante que se fizesse um acompanhamento de diferentes genótipos, durante diferentes durações, permitindo verificar se existe genótipos que começarão a emitir lançamentos após 60 dias na bancada de crescimento.

6. Referências Bibliográficas

- Almássy, A., & Kollányi, G. (2016). Endodormancy and required chill units for raspberry canes of four raspberry cultivars. In XI International Rubus and Ribes Symposium 1133 (pp.253-258). DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1133.39
- AJAP (2017). *Manual Boas Práticas para Culturas Emergentes: A Cultura da Framboesa*. Lisboa: GMT Gráficos, 49pp. https://culturasemergentes.ajap.pt/wp-content/uploads/2019/01/Manual_Culturas_Emergentes_Framboesa_Digital-min.pdf
- Atkinson, D. (1973). Seasonal changes in the length of white unsuberized root on raspberry plants grown under irrigated conditions. *Journal of Horticultural Science*, 48(4), 413-419. DOI: 10.1080/00221589.1973.11514545
- Baker, D.A. (2000). Vascular transport of auxin and cytokinins in *Ricinus*. *Plant Growth Reg.*, 32, 157–160.
- Bathey, N. H. (1998). Genetic and environmental control of flowering in strawberry. *Genetic and environmental manipulation of horticultural crops*.
- Brierley, W. G. (1930). A study of senescence in the red raspberry cane. *Minn. agric. Expt. Sta. Bull.* 69.
- Brierley, W. G., & Landon, R. H. (1945). Some relationships between rest period, rate of hardening, loss of cold resistance and winter injury in the Latham raspberry. *In Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 47, 224-234.
- Carew, J. G., Gillespie, T., White, J., Wainwright, H., Brennan, R., & Bathey, N. H. (2000). The control of the annual growth cycle in raspberry. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(5), 495-503. DOI: 10.1080/14620316.2000.11511275
- Carew, J. G., Mahmood, K., Darby, J., Hadley, P., & Bathey, N. H. (2001). The effects of low temperatures on the vegetative growth and flowering of the primocane fruiting raspberry 'Autumn Bliss'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76(3), 264-270. DOI: 10.1080/14620316.2001.11511361
- Chambers, J. (1961). The production and maintenance of virus-free raspberry plants. *Journal of Horticultural Science*, 36(1), 48-54.
- Christensen, J. R. (1947). Root studies. XI. Raspberry root systems. *Journal of Pomology and Horticultural Science*, 23(4), 218-226. DOI: 10.1080/03683621.1947.11513671
- Deak, K. I., & Malamy, J. (2005). Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal*, 43(1), 17-28. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02425.x
- Eliasson, L. (1971a). Growth regulators in *Populus tremula* III. Variation of auxin and inhibitor level in roots in relation to sucker formation. *Physiologia Plantarum*, 25, 118-121.
- Eliasson, L. (1971b). Growth regulators in *Populus tremula* II. Effect of light on inhibitor content in root suckers. *Physiologia Plantarum*, 24, 205-208.

Eliasson, L. (1971c). Growth regulators in *Populus tremula* IV. Apical dominance and suckering in young plants. *Physiologia Plantarum*, 25, 263-267.

Esau, K. (1965). *Plant anatomy*. John Wiley and Sons, New York.

Eshel, A., Beeckman, T. (2013). *Plant roots: the hidden half*. (4thEd.). CRC press.

Farmer, R. E. (1962). Aspen root sucker formation and apical dominance. *Forest Science*, 8, 403-410.

FAOSTAT (2020). Crops and livestock products. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

Friml, J., Palme, K. (2002). Polar auxin transport—old questions and new concepts? *Plant Mol. Biol.*, 49, 273–284.

Gifford, G. F. (1967). The influence of growth media, temperatures and light intensities on aspen root and top growth (Research Note INT-67). Ogden, UT: USDA Forest Service.

Grubb, N.H., and Harris, R. V. (1945). The planting and maintenance of raspberry cane nurseries. Rep. E. Malting Res. Sta. for 1944, 109-13.

Harper, J. L. (1977). *Population biology of plants*. Academic Press, London

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies Jr, F. T. (1990). *Plant propagation. Principles and practices*. (5th Ed.). Englewood Cliffs, N.J: Prentice-Hall.

Head, G. C. (1967). Effects of seasonal changes in shoot growth on amount of unsuberized root on apple and plum tree. *Journal of Horticultural Science*, 42, 169-180. DOI: 10.1080/00221589.1967.11514205

Heydecker, W., Marston, M. E. (1968). Quantitative studies on the regeneration of raspberries from root cuttings. *Hort. Res*, 8, 142-146.

Hodge A 2006. Plastic plants and patchy soils. *J Exp Bot* 57:401–411.

Hodge, A., Berta, G., Doussan, C., Merchan, F., Crespi, M. (2009). Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil*, 321, 153–187.

Hopkins, W.G. (1999). *Introduction to plant physiology*. 2nd Ed. John Wiley & Sons, New York, pp 325–328.

Horton, K. W. & Maini, J. S. (1964). Aspen reproduction: Its characteristics and control (Rep. 64-0-12). Ottawa, ON: Forest Research Branch, Canadian Department of Forestry and Rural Development.

Hudson, J. P. (1954). Propagation of Plants by Root Cuttings: I. Regeneration of Raspberry Root Cuttings. *Journal of Horticultural Science*, 29(1), 27-43. DOI: 10.1080/00221589.1954.11513797

Hudson, J. P. (1958). Effects of weather on plant behaviour. *Nature*, 182(4646), 1337-1340.

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. DOI: 10.1080/00221589.1959.11513955

Instituto Nacional de Estatística. (2020). Portal do Instituto Nacional de Estatística. Retrieved from <http://www.ine.pt/>

Jansen, L., Demeulenaere, M., Beeckman, T., (2013) II. Root Structure. 6. Lateral Root Development. *Plant Roots the hidden half*. (4^a Eds.), (1), CRC press, (6)1-9.

Jennings, D.L. (1988). Raspberries and Blackberries: Their Breeding, Diseases and Growth (London, UK: Academic Press), pp.230.

Johansson, T., & Lundh, J. E. (1988). Sucker production from root cuttings of *Populus tremula* in relation to growing conditions. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 3(1-4), 75-82.

Kramer, P. (2012). Physiology of woody plants. Elsevier.

Landhäusser, S. M. & Lieffers, V. J. (1997). Seasonal changes in carbohydrate storage and regrowth in rhizomes of and stems of four boreal forest shrubs. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 12, 27-32.

Lang, G. A., Early, J. D., Arroyave, N. J., Darnell, R. L., Martin, G. C. and Stutte, G. W. (1985). Dormancy: Toward a reduced, universal terminology. *HortScience*, 20, 809-812.

Lang, G.A., Early, J.D., Martin, G.C., and Darnell, R.L. (1987). Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* 22 (3), 371–377.

Letham, D.S. (1994). Cytokinins as phytohormones-sites of biosynthesis, translocation and function of translocated cytokinin. In *Cytokinins-Chemistry, Activity, and Function*. Eds. D.W.S. Mok and M.C. Mok. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, pp 57–80.

Lewis, D. R., Muday, G. K., (2013) III. Regulation of root growth: 15. Ethylene Regulates Root Growth and Development. *Plant Roots the hidden half*. T. (4^a Eds.), CRC press, (15) 1-11.

Lomax, T.L., Muday, G.K., Rubery, P.H., (1995). Auxin transport. In *Plant Hormones-Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Ed. P.J. Davies. Kluwer Academic, Dordrecht, Boston, pp 509–530.

Lovell, P.H., White, J., (1986). Anatomical changes during adventitious root formation. In: Jackson MB, editor. *New Root Formation in Plants and Cuttings*, pp 111–140.

Mage, F. (1975). Dormancy in buds of red raspberry. *Meldinger fra Norges Landbrukshøgskole*, 54, No. 21. 24 pp.

Maini, J. S. & Horton, K. W. (1966). Vegetative Propagation of *Populus* spp. I. Influence of temperature on formation and initial growth of aspen suckers. *Canadian Journal of Botany*, 44, 1183-1189.

Maini, J. S. (1967). Variation in the vegetative propagation of *Populus* in natural populations. *Bulletin of the Ecological Society of America*, 48, 75-76.

Malamy, J. E., (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.*, 28, 67–77.

Malamy, J. E., Benfey, P. N., (1997a). Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci.*, 2, 390–396.

Malamy, J.E., Benfey, P. N., (1997b) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124, 33–44.

Meyer, C. J., Peterson, C. A., (2013) em Eshel, A., & Beeckman, T. (Eds.). (2013). *Plant roots: the hidden half*. CRC press.

Neocleous, D., Papadopoulos, I., & Vasilakakis, M. (2005). Growing red raspberry in soilless culture under different chilling treatments for early summer production. *Small Fruits Review*, 4(4), 37-48. DOI: 10.1300/J301v04n04_06

Oliveira, P. B, Valdiviesso, T., Esteves, A., Mota, M., Fonseca., L. L. (2007). A planta de framboesa: Morfologia e fisiologia. *Divulgação Agro* 556 (1), 36pp. http://www.iniav.pt/fotos/gca/1_a_planta_de_framboesa_morfologia_e_fisiologia_1369128261.pdf

Palonen, P., Pohjola, M. & Karhu, S. (2015) Cropping potential of raspberry long-cane plants is affected by their growing conditions and duration of cold storage, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90:6, 738-746, DOI: 10.1080/14620316.2015.11668740

Perrot-Rechenmann, C., (2013) Regulation of root growth: 12. Lateral Root Development. *Plant Roots the hidden half*. Eshel, A., & Beeckman, T. (4^a Eds.), CRC press, (12), 1-11.

Robinson, J. C., Schwabe, W. W. (1977). Studies on the regeneration of apple cultivars from root cuttings I. Propagation aspects. *Journal of Horticultural Science*, 52, 205-220.

Rutherford, P.P., Sewell, A.P. (1972). Carbohydrate changes during the cold storage of rhubarb roots, cultivar Victoria. *Experimental Hort.* 24, 37-42.

Sakai, A. (1966). Seasonal variations in the amounts of polyhydric alcohol and sugar in fruit trees. *Journal of Horticultural Science*, 41, 207–213.

Schier, G. A. & Zasada, J. C. (1973). Role of carbohydrate reserves in the development of root suckers in *Populus tremuloides*. *Canadian Journal of Forest Research*, 3, 243-250 DOI: 10.1139/x73-033

Schier, G. A. (1972). Apical dominance in multishoot cultures from aspen roots. *Forest Science*, 18, 147-149.

Schmuelling, T. (2002). New insights into the functions of cytokinins in plant development. *J. Plant Growth Reg.* 21, 40–49.

Shepperd, W. D. (1996). Response of aspen root suckers to regeneration methods and post-harvest protection (Research Paper, RM-RP-324). Fort Collins, CO: USDA Forest Service.

Simonds, A. O. (1942). Histological study of freezing, desiccation, and winter injury of raspberry canes. *Botanical Gazette*, 104(2), 356-361. DOI: 10.1086/335140

Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24673-24706. DOI: 10.3390/ijms161024673

- Sønsteby, A. and Heide, O. M. (2008). Environmental control of growth and flowering of *Rubus idaeus* L. cv. Glen Ample. *Scientia Horticulturae*, 117, 249–256.
- Sønsteby, A. and Heide, O. M. (2009). Effects of photoperiod and temperature on growth and flowering of the annual (primocane) fruiting raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivar Polka. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 84, 439–446
- Stenecker, G. A. (1974). Factors affecting the suckering of trembling aspen. *Forestry Chronicle*, 50, 32-34
- Tew, R. K. (1970). Root carbohydrate reserves in vegetative reproduction of aspen. *Forest Science*, 16, 318-320.
- Torrey, J. G. (1976). Root hormones and plant growth. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 27, 435-459
- Von Nägeli C. (1858). Beiträge zur Wissenschaftlichen Botanik. Leipzig, Germany: von Wilhelm Engelmann.
- Vorončihina, Z. N. (1967). The root system of raspberries. (Russian). *Dokl. Mosk. Sel'hoz. Akad. K. A. Timitjazeva*, 132, 55-59
- Wan, X., Landhäusser, S.M., Lieffers, V., and Zwiazek, J.J. (2006). Signals controlling root suckering and adventitious shoot formation in aspen (*Populus tremuloides*). *Tree Physiol.* 26, 681–687
- Wareing, P. F. (1956). Photoperiodism in woody plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 7, 191-214.
- White, J. M., Wainwright, H., & Ireland, C. R. (1998, January). Endodormancy and paradormancy in the raspberry cultivar ‘Glen Clova’. *In VII International Symposium on Rubus and Ribes 505* (pp. 199-206). DOI: 10.17660/ActaHortic.1999.505.25
- Whitney, G. G. (1982). The productivity and carbohydrate economy of a developing stand of *Rubus idaeus*. *Canadian Journal of Botany*, 60, 2697-2703.
- Williams, I. H. (1959a). Effects of environment on *Rubus idaeus* L. III. Growth and dormancy of young shoots. *Journal of Horticultural Science*, 34(4), 210-218. DOI: 10.1080/00221589.1959.11513961
- Williams, I. H. (1959b). Effects of environment on *Rubus idaeus* L.: IV. Flower initiation and development of the inflorescence. *Journal of Horticultural Science*, 34(4), 219-228. DOI: 10.1080/00221589.1959.11513962
- Williams, I. H., Hudson, J. P. (1956). *Nature*, 177, 789
- Zasada, J. C., Tappeiner, J. C., Maxwell, B. D. & Radwan, M. A. (1994). Seasonal changes in shoot and root production and in carbohydrate content of salmonberry (*Rubus spectabilis*) rhizome segments from central Oregon Coast Ranges. *Canadian Journal of Forest Research*, 24, 272-277

ANEXOS

ANEXO 1 – Protocolo de Histologia utilizado no ensaio 3 desde a desidratação dos gomos até à preparação de lâminas definitivas.



HISTOLOGIA – preparação de amostras de gomos de raiz

Data de início:		Amostras:	
Dia 1	Desidratação da amostra (já fixada e conservada em álcool 70%)		
	1. Álcool 80%	1h	
	2. Álcool 96%	1h	
	3. Álcool 100%	1h	
	4. Álcool 100%	1h	
	5. Álcool 100%	1h	
	6. Histoclear	noite	
	Obs.: antes de passar para o álcool seguinte fazer lavagem (com o seguinte)		
Dia 2	7. Mudar amostra para frasco com parafina – estufa (60°C) Obs.: ligar placa quente para colocar a parafina no copo; colocar primeiro a parafina e depois a amostra (para não entrar ar); verificar se há parafina na estufa no <u>DIA ANTERIOR</u>	noite	
Dia 3	Montagem em parafina		
	8. Aquecer o molde	-	
	9. Colocar uma base de parafina	-	
	10. Fixar a amostra para baixo e na diagonal, pressionar numa superfície fria	-	
	11. Colocar a cassete por cima – id da amostra a lápis	-	
	12. Encher de parafina	-	
	13. Tirar ar com agulha nas ranhuras da cassete	-	
	14. Colocar numa base com água	-	
	15. Frigorífico	noite	
Dia 4/5	Corte no micrótopo		
	Obs.: travar a manivela para manipulações da amostra Verificar a espessura da amostra (10µm) Verificar a lâmina		
	16. Colocar a amostra no micrótopo – orientação – a parte maior/ mais densa da amostra para baixo – marcar na cassete	-	
	17. Orientar a amostra paralela à lâmina	-	
	18. Cortar até aparecer a amostra no corte	-	
	19. Hidratar – colocar em água voltada para baixo	1h30min	
	Preparação da lâmina de microscópio		
	20. Limpar com álcool – id da amostra a lápis	-	
	21. Aplicar cola (mistura de gelatina com glicerol)	-	
	22. Aquecer	-	
	23. Colocar água abundante	-	
Corte			
24. Colocar a amostra no micrótopo e nivelar de acordo com o corte	-		

inicial		
25. Cortar e transpor para a lâmina (2/ 3 cortes/ lâm, 5 lâm/ amostra, andar para a frente entre lâminas	-	
26. Aquecer as lâminas para esticar o corte	30min	
Coloração		
27. Histo-clear I	5min	
28. Histo-clear II	5min	
29. Esguicho de álcool 96%	-	
30. Álcool 100%	5min	
31. Álcool 96%	5min	
32. Álcool 70%	2min	
33. Água	2min	
34. Astra blue + safranina (deixar película)	-	
35. Esguicho de álcool 96%	-	
Montagem		
36. Passar por álcool 100%	-	
37. Passar por histo-clear – deixar película	-	
38. Aplicar balsamo do Canadá na lamela e montar	-	
39. Secar na estufa (40°C)	noite	
40. OBSERVAR ☺		