

## Melhoramento para elevada qualidade pós-colheita: validação do método de selecção de génotipos promissores

D.R.A. Carvalho<sup>1</sup>, S.M.P. Carvalho<sup>1,2</sup>, D. Fanourakis<sup>2</sup>, E. Heuvelink<sup>2</sup> & D.P.F. Almeida<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>CBQF/Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal

<sup>2</sup>Horticultural Supply Chains Group, Universidade de Wageningen, Holanda

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

\* Autor correspondente: dalmeida@fc.up.pt

### Resumo

O stress hídrico é uma das principais causas que leva à redução da longevidade pós-colheita de flores de corte diminuindo a satisfação do consumidor. Este problema é acentuado em plantas produzidas em ambiente de humidade relativa elevada (i.e. HR > 85%) devido a uma disfunção estomática com implicações negativas na longevidade em jarra. Num estudo anterior, uma população tetraplóide segregante de rosas (60 génotipos) cultivada em estufa em condições de HR não controladas foi objecto de ‘screening’ para o controlo de perda de água. A fenotipagem desta população revelou diferenças muito acentuadas ao nível do conteúdo relativo em água (CRA) após 4 h de desidratação de folíolos. O presente trabalho teve como objectivo validar o método de selecção de génotipos com boa resposta estomática à desidratação (i.e. elevado CRA após 4 h de desidratação) quando produzidos em condições contrastantes de HR. Assim, foram seleccionados cinco génotipos, em que se estimava uma boa resposta estomática à desidratação, sendo estes posteriormente cultivados em condições de HR moderada (60%) e HR elevada (90%). O CRA dos cinco génotipos diferiu significativamente entre si. O génotipo K099 revelou-se o mais tolerante à desidratação, apresentando um CRA após 4 h de desidratação do folíolo 19% superior ao CRA do génotipo menos tolerante. Génotipos cultivados em ambiente de HR elevada apresentaram em média um CRA apenas 10% inferior ao observado

em génotipos cultivados em HR moderada, confirmando a existência de uma boa resposta estomática.

A longevidade pós-colheita registou valores médios entre 12 (K119) e 25 (K099) dias, verificando-se um efeito não significativo da HR. Concluiu-se que a análise da resposta estomática em folhas destacadas de roseira é um método eficaz que permite, numa fase inicial da selecção, identificar génotipos tolerantes à HR elevada.

**Palavras-chave:** estomas, humidade relativa, *Rosa × hybrida*, taxa de transpiração, vida em jarra.

### **Abstract**

**Breeding for better keeping quality: validation of the selection method of promising genotypes.**

Water stress is one of the most important postharvest quality problems, resulting in shorter vase life and reduced consumer's satisfaction. This problem is enhanced in plants grown at high RH (RH > 85%) due to stomatal malfunctioning leading to shorter postharvest longevity. Previously, a subset of a segregating tetraploid population (60 genotypes) cultivated in a greenhouse under non-controlled RH was characterized for stomatal responsiveness to water stress (i.e. desiccation). The population screening revealed extreme differences of relative water content (RWC) after 4 h leaf desiccation. This study aims at the validation of a selection method for promising genotypes with good stomatal responsiveness to desiccation (i.e. high RWC after 4 h desiccation) when grown under contrasting HR conditions. Therefore, five genotypes with expected good stomatal response to desiccation were selected for this study. These genotypes were grown under moderate RH (60%) and high RH (90%). The RWC was significantly different within the five studied genotypes. K099 was the most tolerant genotype to desiccation, with a RWC after 4 h desiccation 19% higher than the least tolerant genotype. Genotypes cultivated at high RH had on average only 10% lower RWC, as compared to genotypes grown at moderate RH, confirming a good stomatal response. The postharvest longevity varied between 12 (K119) and 25 (K099) days and it was not significantly affected by the two different RH during growth. It is concluded that the analysis of the stomatal responsiveness in leaves of cut roses is an efficient

method that allows, in the early stages of the selection process, to identify tolerant genotypes to high RH.

**Keywords:** relative humidity, *Rosa × hybrida*, stomata, transpiration rate, vase life.

### **Introdução**

Devido ao aumento da competição registada no sector da horticultura ornamental, a produção de plantas ornamentais de elevada qualidade tem vindo a adquirir uma importância crescente. A longevidade pós-colheita de flores de corte é um factor decisivo para a satisfação do consumidor. Os factores anatómicos e fisiológicos que determinam a longevidade potencial de uma haste floral cortada são pré-definidos na fase de produção. Desta forma, a longevidade potencial resulta de uma complexa interacção entre o genótipo e as condições ambientais durante a fase de cultivo (van Meeteren et al., 2005). A humidade relativa (HR) elevada (> 85%) durante o período de cultivo (pré-colheita) é um factor ambiental crítico no decréscimo da qualidade de várias espécies ornamentais. HR elevada durante a produção afecta negativamente o controlo da perda de água devido a um mal funcionamento estomático, resultando numa diminuição da longevidade pós-colheita (Mortensen & Fjeld, 1998; Mortensen and Gislerød, 1999; Torre & Fjeld, 2001). Plantas produzidas em condições de elevada HR, comparadas com plantas produzidas em condições de HR moderada, mostram menor capacidade de resposta por parte dos estomas, quando estes são sujeitos a estímulos de fecho como por exemplo desidratação (Fordham et al., 2001; Torre & Fjeld, 2001; Rezaei Nejad & van Meeteren, 2005). Contudo, conhecem-se diferenças de susceptibilidade entre cultivares de rosas a este problema (Mortensen & Gislerød, 1999; Mortensen & Gislerød, 2000; Torre et al., 2003). Apesar da vida em jarra ser uma característica valorizada pelos melhoradores, a sua análise ocorre numa fase avançada do processo de selecção podendo, contudo, inviabilizar a selecção de determinada cultivar. Num estudo anterior, uma população tetraploide segregante de rosas (60 descendentes) resultante do cruzamento de dois progenitores tetraploides (P540 e P867) foi objecto de 'screening' para a hidro-sensibilidade dos estomas (i.e. resposta dos estomas após 4 h de desidratação da folha) (Fanourakis et

al., 2010). O presente estudo teve como objectivo validar o método de selecção de génotipos para uma boa resposta estomática à desidratação. A rosa foi utilizada como modelo, uma vez que se trata de uma espécie com elevada importância económica a nível mundial e com uma elevada segregação para esta característica.

## Material e Métodos

### Produção do material vegetal e condições de crescimento.

Com base nos resultados de um estudo anterior foram seleccionados cinco génotipos de uma população tetraplóide segregante de rosas, em que se estimava uma boa resposta estomática à desidratação (Fanourakis et al., 2010). Estacas desses génotipos foram obtidas e enraizadas na Holanda (Universidade de Wageningen). Posteriormente estas foram plantadas em vasos de 3,5 L contendo uma mistura de turfa (Floragard, mistura especial de turfa negra à base de musgo *Sphagnum*) e perlite (Otavi) (2:1, v/v). Ao longo do ciclo cultural apenas se permitiu o desenvolvimento de uma haste floral por planta, correspondendo a uma densidade de plantação de 29 plantas m<sup>-2</sup>. Quatorze plantas por génotipo foram aleatoriamente distribuídas (7+7) por duas câmaras fitoclima do tipo “walk-in” (Aralab, modelo 5000 EH, 2,0 x 1,6 x 2,0 m, Albarraque, Portugal.). As condições de crescimento mantiveram-se constantes durante todo o ciclo de crescimento da cultura. Uma das câmaras apresentou 19 ± 0,5 °C de temperatura e 62 ± 2% de HR, resultando num DPV (défice de pressão de vapor) de 0,83 ± 0,02 kPa. A segunda câmara apresentou 19 ± 1°C de temperatura e 89 ± 4% de HR, resultando num DPV de 0,24 ± 0,07 kPa. Nas duas câmaras a concentração de CO<sub>2</sub> durante o período diurno foi de 350 ± 20 μmol mol<sup>-1</sup> (Indoor Air Quality Meter, IAQ 910, TSI Incorporated, Shoreview, MN, EUA). Lâmpadas fluorescentes (Osram L58W/840, Lumilux, Cool White, Alemanha) forneceram um fotoperíodo de 18 h diárias de 200 ± 10 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de radiação fotossinteticamente activa (Li-Cor, Li-1000 datalogger, Lincoln, Nebraska, EUA). A intensidade luminosa foi medida 50 cm acima do nível do solo. As plantas foram regadas diária e automaticamente com uma solução nutritiva com a seguinte composição: macronutrientes (mM): NH<sub>4</sub> 1,0; K 4,0; Ca 3,5; Mg 1,375; NO<sub>3</sub> 10,5; SO<sub>4</sub> 1,5; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25; micronutrientes (μM): Fe 25, Mn 5; Zn 3,5; B 20; Cu 0,75; Mo 0,5. O pH da solução foi corrigido para valores entre 5,0 e 5,5 (Eutech Instruments, pH 5+, Eutech

Instruments Europe bv, Nijkerk, Holanda) recorrendo a HCl 3 M. A condutividade eléctrica registou-se nos 2 mS/cm (Eutech Instruments, Cond 6+, Eutech Instruments Europe bv, Nijkerk, Holanda).

**Resposta dos estomas a HR elevada durante o crescimento das folhas.** De modo a avaliar a resposta dos estomas em cinco génotipos cultivados em HR contrastantes, quando sujeitos a estímulos de fecho (desidratação), folíolos terminais de folhas pentafoliadas completamente expandidas e jovens (i.e. posição 1 a contar do ápice) foram destacados da planta, cortados debaixo de água e colocados a re-hidratar (pecíolo submerso em pequenos frascos contendo água) durante uma hora em tabuleiros envoltos em sacos plásticos (maximização da turgescência das folhas). Depois da fase de re-hidratação os folíolos permaneceram em condições constantes de evapotranspiração ( $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ,  $54 \pm 1\%$  HR,  $45 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e a sua resposta estomática foi avaliada gravimetricamente ao longo do tempo por um período de 4 h (balança Kern, ABJ, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Alemanha). Foram avaliados sete folíolos (um por planta) em cada génotipo e cada HR.

**Avaliação da longevidade pós-colheita.** Para avaliar o comportamento pós-colheita de cada génotipo, hastes florais foram colhidas no estado dois do botão floral (i.e. quando o botão floral perde a forma pontiaguda e uma a duas pétalas se separa do botão conferindo-lhe uma forma cilíndrica) (VBN, 2001). As hastes florais apresentaram os seguintes comprimentos: K015:  $22 \pm 1$  cm; K059:  $32 \pm 1$  cm; K099  $30 \pm 0,5$  cm; K107:  $33 \pm 1$  cm; K119:  $24 \pm 1,5$  cm. Permitiu-se que cada haste aspirasse ar durante 2-3 minutos e a base das hastes florais foi limpa com uma solução de hipoclorito de sódio 5%, pH 13 (lixívia comercial). As hastes foram posteriormente colocadas em frascos com 200 ml de uma solução com a seguinte composição: 0,7 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0,005 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (van Meeteren et al., 2000). Este ensaio pós-colheita decorreu numa câmara fitoclima (Aralab, S600PLH, 0,66 x 0,62 x 1,44 m, Albarraque, Portugal) com condições controladas ( $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ,  $54 \pm 1\%$  HR, fotoperíodo de 12 h diárias fornecido por lâmpadas fluorescentes  $10 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  radiação fotossinteticamente activa). O término da pós-colheita foi determinado segundo os critérios VBN (2001) [‘bent-neck’: desidratação e dobragem do pedunculo formando um ângulo superior a 90%; extremidades das pétalas desidratadas: cinco ou mais pétalas tornaram-se castanhas ou negras nas

extremidades ( $> 1$  cm), algumas secaram; término de floração: a flor atingiu o máximo de abertura e as pétalas começaram a cair ( $>$  duas pétalas caídas); emurchecimento da flor: emurchecimento presente ou as pétalas tornaram-se rugosas; emurchecimento de folhas:  $> 50\%$  da folhagem murchou; abscisão de folhas:  $> 50\%$  de folhas caíram]. Durante o período da pós-colheita frascos e flores foram pesados (balança Kern, PB, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Alemanha) duas vezes por dia (no início e fim do fotoperíodo) permitindo o cálculo da taxa de transpiração e dinâmica do peso fresco das flores ao longo do tempo. Foram avaliadas sete hastes de cada genótipo e de cada HR.

## Resultados e Discussão

De modo a determinar a resposta estomática ao estímulo de fecho, folíolos terminais de folhas completamente expandidas foram sujeitos a desidratação durante 4 h. Ao longo desse tempo a taxa de transpiração (fig. 1A) e o CRA (fig. 1B) de hastes florais produzidas em ambiente de HR contrastantes mostraram-se muito semelhantes em cada genótipo (e.g. fig. 1; para os restantes quatro genótipos os resultados não são apresentados), revelando uma tolerância destes genótipos à HR elevada (Fanourakis et al., 2011). Existe um efeito significativo da HR ( $P = 0,001$ ) e dos genótipos ( $P = 0,005$ ) no estado de hidratação dos folíolos depois de 4 h de desidratação (CRA). Genótipos cultivados em ambiente de HR elevada apresentaram em média um CRA 10% inferior ao CRA observado em genótipos cultivados em HR moderada (fig. 2A). O genótipo K099 revelou-se o mais tolerante à desidratação, apresentando um CRA após 4 h de desidratação do folíolo 19% superior ao CRA do genótipo menos tolerante (fig. 2B).

Para avaliar o comportamento pós-colheita de cada um dos genótipos e verificar se a um CRA mais elevado corresponde uma longevidade em jarra superior realizou-se um ensaio de longevidade em jarra. Neste ensaio foi possível observar um efeito significativo do genótipo ( $P = 0,000$ ) na longevidade das hastes. O genótipo K099 apresenta uma longevidade notoriamente superior (81%) à dos restantes genótipos, tendo uma vida em jarra de 25 dias. Os demais genótipos apresentam uma longevidade em jarra não significativamente diferente entre si, variando entre 12 e 14 dias (fig. 3). No entanto a HR durante o período de cultivo não apresentou um

efeito significativo ( $P = 0,178$ ) na longevidade dos génotipos em estudo.

Relativamente à taxa de transpiração diurna ( $P = 0,011$ ) e à taxa de transpiração nocturna ( $P = 0,001$ ) das hastes florais durante o período de pós-colheita, verificou-se uma interacção significativa entre HR e génotipo. De um modo geral, hastes produzidas num ambiente de HR elevada apresentam um aumento da taxa de transpiração diurna entre 5 e 37% (fig. 4A) e nocturna (fig. 4B) entre 28 e 78%, dependendo do génotipo. Relacionando as fig. 3 e 4, pode observar-se que o génotipo com maior longevidade em jarra corresponde ao génotipo com uma menor taxa de transpiração durante o período pós-colheita. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos num estudo anterior pelos mesmos autores (Fanourakis et al., 2010), onde se concluiu que taxas de transpiração mais elevadas durante a fase de pós-colheita são um factor limitativo para longevidades de pós-colheita elevadas. No que respeita à evolução do peso fresco das hastes florais ao longo do período de pós-colheita, não se verificaram diferenças entre as hastes cultivadas em diferentes ambientes de HR, em nenhum dos génotipos estudados (e.g. fig. 5; para os restantes quatro génotipos os resultados não são apresentados). Entre génotipos os comportamentos foram bastante consistentes e semelhantes ao padrão representado na figura 5. O peso fresco das hastes florais aumentou ligeiramente após o início do ensaio de pós-colheita em consequência da abertura da flor. Posteriormente, a haste diminuiu gradualmente o seu peso em consequência de uma menor absorção de água comparativamente à perda de água, resultando num balanço hídrico negativo (fig. 5).

## Conclusões

Os génotipos avaliados mostraram-se efectivamente tolerantes à HR elevada quer na resposta dos estomas à desidratação quer na longevidade das hastes florais durante o período de pós-colheita. Embora a amplitude da resposta dos génotipos utilizados não cobrisse toda a variabilidade existente na roseira, a análise da resposta estomática em folhas destacadas (através da quantificação do conteúdo relativo em água após 4 h de desidratação) é um método eficaz para a selecção de génotipos tolerantes a HR elevadas durante a produção permitindo, numa fase inicial do processo de selecção, eliminar os génotipos menos tolerantes.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) o apoio financeiro através do projecto PTDC/AGR-AAM/67082/2006 e da bolsa de doutoramento SFRH/BD/72924/2010 a D.R.A. Carvalho.

## **Referências**

- Fanourakis, D., Carvalho, D.R.A., Gitonga, V.W., Van Heusden, A.W., Almeida, D.P.F., Heuvelink, E. & Carvalho, S.M.P. 2010. Breeding cut roses for better keeping quality: first steps. *Acta Horticulturae* (In Press).
- Fanourakis, D., Carvalho, S.M.P., Almeida, D.P.F. & Heuvelink, E. 2011. Avoiding high relative air humidity during critical stages of leaf ontogeny is decisive for stomatal functioning. *Physiologia Plantarum* 142: 274-286.
- Fordham, M.C., Harrison-Murray, R.S., Knight, L. & Evered C.E. 2001. Effects of leaf wetting and high humidity on stomatal function in leafy cuttings and intact plants of *Corylus maxima*. *Physiologia Plantarum* 113: 233-240.
- Mortensen, L.M. & Fjeld, T. 1998. Effects of air humidity, lighting period and lamp type on growth and vase life in roses. *Scientia Horticulturae* 73: 229-237.
- Mortensen, L.M. & Gislerød, H.R. 1999. Influence of air humidity and lighting period on growth, vase life and water relations of 14 rose cultivars. *Scientia Horticulturae* 82: 289-298.
- Mortensen, L.M. & Gislerød, H.R. 2000. Effect of air humidity on growth, keeping quality, water relations, and nutrient content of cut roses. *Gartenbauwiss* 65: 40-44.
- Rezaei Nejad A. & Van Meeteren, U. 2005. Stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* grown at high relative air humidity. *Physiologia Plantarum* 125: 324-332.
- Torre, S. & Fjeld, T. 2001. Water loss and postharvest characteristics of cut roses grown at high or moderate relative air humidity. *Scientia Horticulturae* 89: 217-226.
- Torre, S., Fjeld, T., Gislerød, H.R. & Moe, R. 2003. Leaf anatomy and stomatal morphology of greenhouse roses grown at moderate or high air humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128: 598-602.

- van Meeteren, U., van Gelder, H. & van Ieperen, W. 2000. Reconsideration of the use of deionized water as vase water in postharvest experiments on cut flowers. *Postharvest Biology and Technology* 18: 169-181.
- van Meeteren, U., van Gelder, H. & van Ieperen, W. 2005. Effect of growth conditions on post harvest rehydration ability of cut chrysanthemum flowers. *Acta Horticulturae* 669: 287-296.
- VBN. 2001. Evaluation cards for cut flowers. VBN, Leiden, The Netherlands.

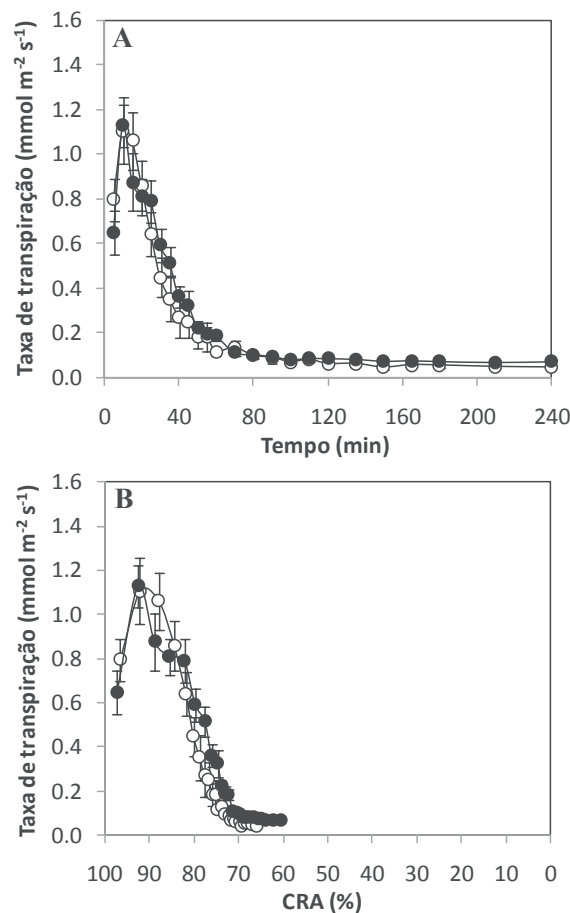


Figura 1 - Taxa de transpiração ao longo de 4 h de desidratação (A) e taxa de transpiração em função do conteúdo relativo em água (CRA) (B) de folíolos do genótipo K107 (representativo dos 5 genótipos de rosa de corte analisados pertencentes à população K5) produzido em condições de HR moderada ( $\circ$ , 60%) e HR elevada ( $\bullet$ , 90%). Valores são as médias de 7 folíolos  $\pm$  erro padrão.

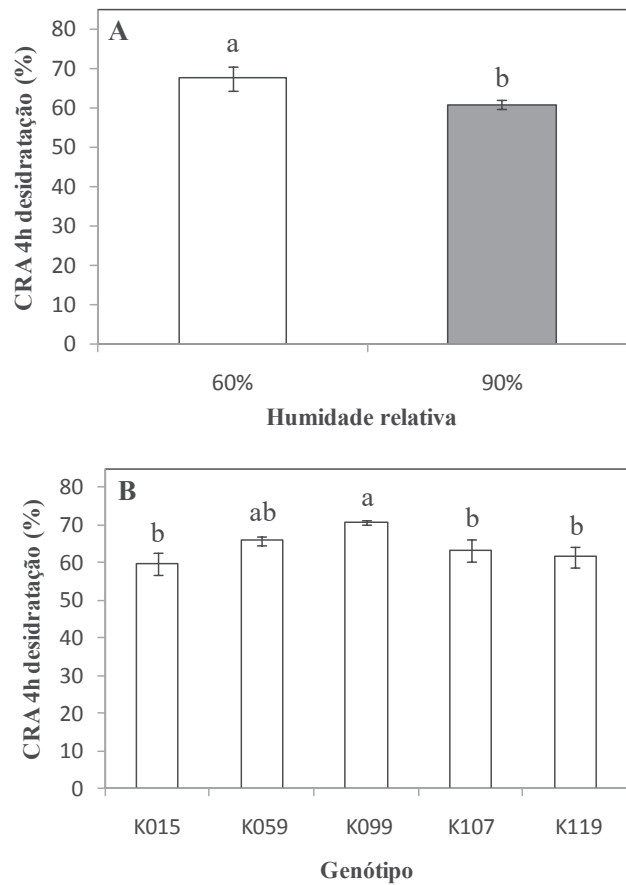


Figura 2 - Conteúdo relativo em água (CRA) em função do efeito da humidade relativa (A) e do genótipo (B) após 4 h de desidratção de folíolos completamente expandidos de rosa de corte pertencentes à população K5. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Duncan a 5%. Em A, valores são as médias de 35 folíolos  $\pm$  erro padrão. Em B, valores são as médias de 14 folíolos  $\pm$  erro padrão.

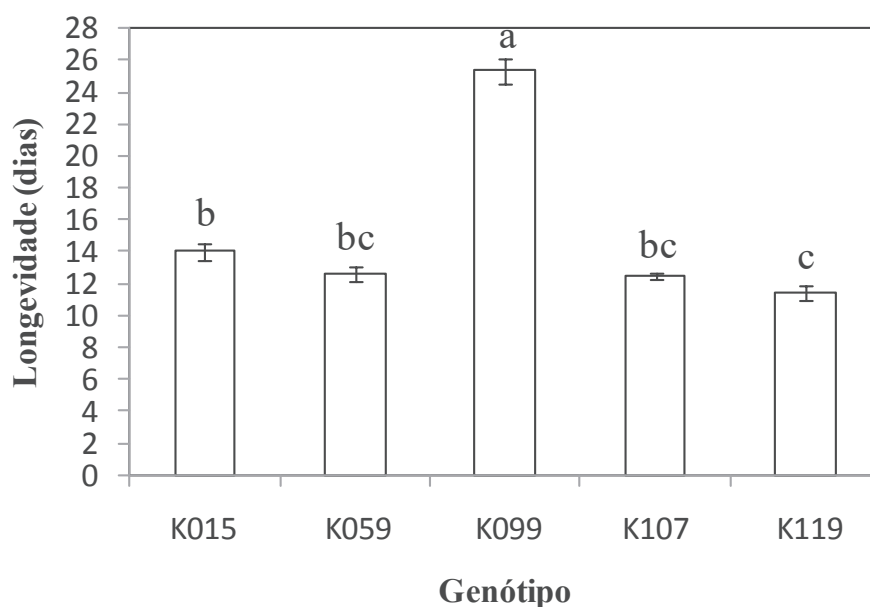


Figura 3 - Longevidade em jarra de hastes florais de genótipos de rosa de corte pertencentes à população K5 produzidas em condições de HR moderada (60%) e HR elevada (90%). O ensaio teve início em hastes cujo botão floral apresentava forma cilíndrica e extremidade pontiaguda no momento da colheita. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Duncan a 5%. Valores são as médias de 14 hastes  $\pm$  erro padrão.

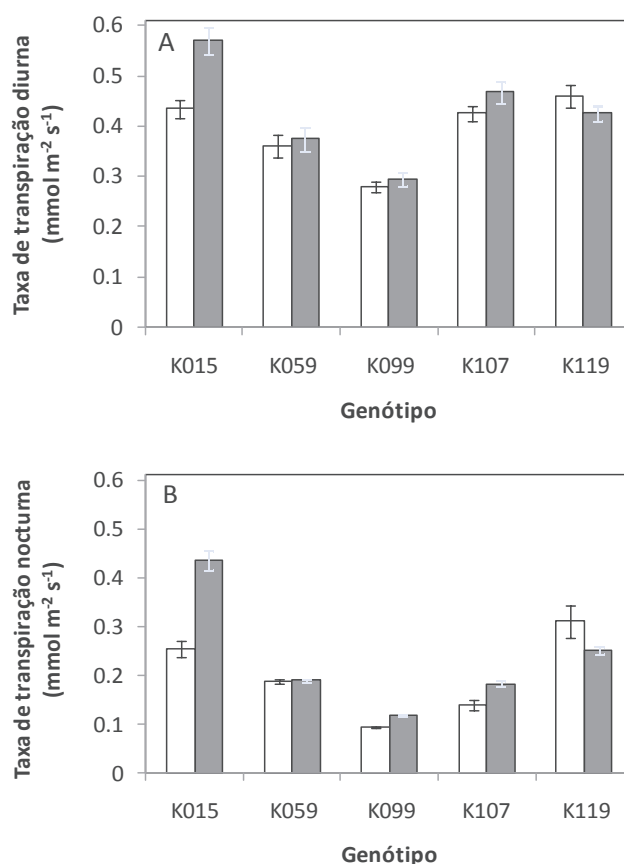


Figura 4 - Médias diurna (A) e nocturna (B) da taxa de transpiração de hastes florais durante o período de pós-colheita em cinco genótipos de rosa de corte pertencentes à população K5 produzidas em condições de HR moderada (barras brancas, 60%) e HR elevada (barras pretas, 90%). O ensaio teve início em hastes cujo botão floral apresentava forma cilíndrica e extremidade pontiaguda no momento da colheita. Valores são as médias de 7 hastes  $\pm$  erro padrão.

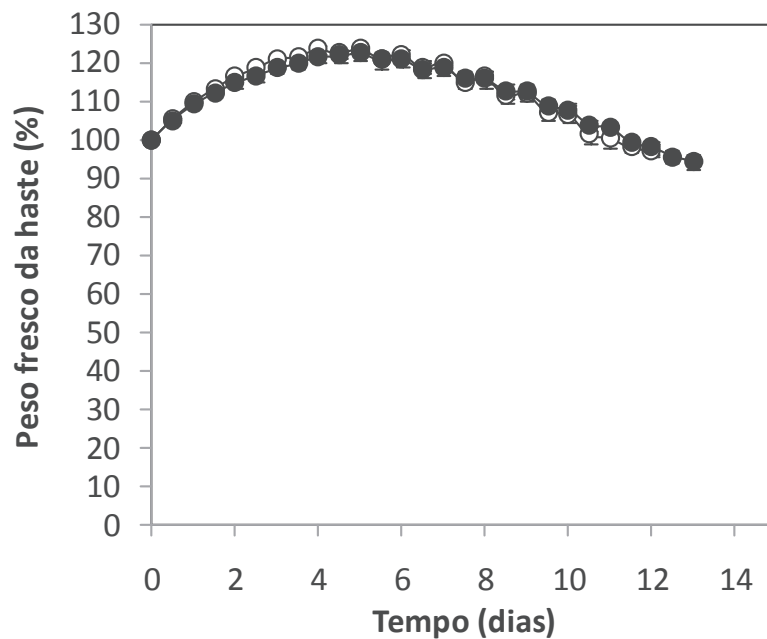


Figura 5 - Peso fresco das hastes florais ao longo do período de pós-colheita do genótipo K107 (representativo dos 5 genótipos de rosa de corte analisados pertencentes à população K5) produzido em condições de HR moderada (○, 60%) e HR elevada (●, 90%). O ensaio teve início em hastes cujo botão floral apresentava forma cilíndrica e extremidade pontiaguda no momento da colheita. Valores são as médias de 7 hastes  $\pm$  erro padrão.