

# **Estudo de algumas características em melhoramento de framboesa: resistência à ferrugem tardia, precocidade e cor do fruto**

**Helena Isabel Vanzeler Campos Rodrigues Novo**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Agronómica**

Orientadores: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota  
Doutor Pedro Nogueira Brás de Oliveira

**Júri:**

Presidente: Doutor José Carlos Franco Santos Silva, Professor Associado no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Pedro Nogueira Brás de Oliveira, Investigador Auxiliar no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Mestre Eugénio Luís Fraga Diogo, Técnico Superior no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, na qualidade de especialista

## Resumo

No âmbito do programa de melhoramento de framboesa, implementado pelo INIAV, I.P. em parceria com a empresa BeiraBaga, foram realizados três cruzamentos com o objetivo de introduzir características de interesse num genótipo com potencial comercial (progenitor feminino), desenvolvido pelo programa.

Do cruzamento com vista a introduzir resistência à doença da ferrugem tardia (*Thekopsora americana*) foram avaliadas, em estufa, 773 plantas previamente inoculadas com o fungo, relativamente à severidade da doença, que apresentou um valor mínimo de 0,2 % e máximo de 46,8%. Destas, foram selecionadas 78 plantas (10,1%), com severidade até 5%, para instalação em campo. A avaliação de campo mostrou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores de severidade entre as famílias resultantes dos três cruzamentos, o progenitor feminino e o progenitor dador de resistência, o que poderá indicar que esta foi efetivamente introduzida.

Do cruzamento com vista a introduzir precocidade, foram avaliadas 1827 plantas em campo, das quais 242 (13,2%) produziram até seis semanas antes do progenitor feminino. Os indivíduos precoces compuseram 12 grupos de precocidade, demorando entre 13 e 18 semanas a produzir, desde a plantação até à primeira colheita, e necessitando de 1359,8 a 1925,7 GDC (TB5°C). Tal como o primeiro, este cruzamento foi bem-sucedido na produção de genótipos precoces com potencial, que poderão passar à próxima fase de avaliação e seleção.

O terceiro cruzamento tinha o objetivo de produzir descendência com frutos de coloração mais clara que o progenitor feminino. Apenas 5 indivíduos do total de 95 avaliados produziram frutos cujos parâmetros de cor medidos ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ ) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) relativamente aos do referido progenitor. Estas diferenças traduziram-se em frutos que cumprem o objetivo delineado, particularmente no caso do indivíduo 449 que apresenta o maior valor de luminosidade ( $L^*_{449}=43,57$ ) e o terceiro maior valor de saturação ( $C^*_{PF}=49,37$ ).

**Palavras-chave:** *Rubus idaeus*, *Thekopsora americana*, produção precoce, sistema CIE, seleção precoce.

## Abstract

Integrated in the raspberry breeding program implemented by INIAV, I.P. in partnership with Beira Baga company, three crosses were made aiming at introducing desirable traits in a high-quality variety (female parent) with commercial potential, developed by the program.

From the cross aiming at introducing resistance to the late leaf rust disease (*Thekopsora americana*), 773 previously inoculated plants were evaluated regarding disease severity, in the greenhouse screening phase. The minimum and maximum registered values were 0,2% and 46,8%, respectively. From those, 78 (10,1%) plants with a maximum severity of 5% were selected, to be installed in the field. The field assessment showed significant differences ( $p < 0,05$ ) in disease severity between the three families, the female parent and the resistance donor parent, which might indicate that some degree of resistance was transmitted to the offspring.

From the cross meant to segregate for earliness, 1827 plants were evaluated in the field, from which 242 (13,2%) were first harvested up to six weeks prior to the female parent. The early individuals composed 12 earliness groups, taking from 13 to 18 weeks from plantation to harvest of the king fruit, requiring 1359,8 to 1925,7 GDD (BT5°). As in the first cross, this second one was successful in producing genotypes with potential to be selected to the next selection stage.

The third and last cross was meant to produce offspring showing fruits of lighter color than that of the fruits of the female parent. Only 5 individuals from a total of 95 evaluated ones exhibited fruits whose measured color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ ) showed significant differences ( $p < 0,05$ ) when compared to those of the female parent. These differences translate into fruit colors that meet the outlined goals, in particular individual 449, which exhibited fruits with the highest lightness value ( $L^*_{449}=43,57$ ) and the third highest value for chroma ( $C^*_{PF}=49,37$ ).

**Key-words:** *Rubus idaeus*, *Thekopsora americana*, early production, CIE variables, early stage selection.

## **Agradecimentos**

Como na maioria dos casos, o período durante o qual esta dissertação foi realizada esteve repleto de obstáculos e desafios, tendo a sua escrita representado, por si só, um desafio também, pelo que tenho a agradecer a todos aqueles que, mesmo sem saber, me ajudaram a levá-la a bom porto.

À Professora Doutora Mariana Mota, orientadora desta dissertação, por todo o apoio, companheirismo, partilha de conhecimento, disponibilidade e por ser um exemplo de resiliência e superação, o meu sincero obrigada.

Ao Doutor Pedro Brás de Oliveira, orientador desta dissertação, pela dedicação, orientação, sentido prático, apoio e companheirismo que sempre teve para comigo, o meu profundo agradecimento.

Dirijo um agradecimento especial ao Doutor Eugénio Diogo, pela pronta disponibilidade, partilha de conhecimento, apoio e ajuda oferecidos no delineamento de protocolos e medições realizadas no INIAV, I.P., polo de Oeiras.

Gostaria também de prestar um agradecimento especial à Doutora Teresa Valdiviesso, investigadora do INIAV, I.P. (Oeiras), pela amizade, companheirismo, disponibilidade e pronta ajuda.

Ao Francisco Luz, coordenador do programa de melhoramento de framboesa, por todo o apoio, ajuda, companheirismo e partilha de conhecimento, o meu agradecimento.

Ao Manuel Roque, colaborador do INIAV, I.P. (Oeiras), pela partilha, companheirismo e amizade, obrigada.

À BeiraBaga, ao INIAV, I.P. (Oeiras) e a todos os seus colaboradores, agradeço a oportunidade e pronta ajuda, que permitiram a realização deste trabalho. Presto um agradecimento especial à Anabela Reis, à Dra. Cândida Trindade e à Doutora Cristina Ramos pela disponibilidade e ajuda.

Por fim, à minha família e amigos, o meu mais profundo, sincero e enorme agradecimento. Por me ampararem as quedas, por estarem lá nos piores momentos, por me apoiarem e não me deixarem desistir nas alturas de maior insegurança, desânimo e dor, e me fazerem ver que sou capaz. Sem eles não me teria sido possível concluir esta etapa.

# Índice

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimentos .....	iii
Índice de figuras.....	vi
Índice de quadros.....	ix
Lista de acrónimos .....	x
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. A cultura da framboesa .....	4
2.1.1. <i>Taxonomia</i> .....	4
2.1.2. <i>Morfologia</i> .....	4
2.1.3. <i>Ciclo cultural</i> .....	6
2.1.4. <i>Exigências edafo-climáticas</i> .....	8
2.2. Melhoramento .....	9
2.2.1. <i>Técnicas de melhoramento</i> .....	11
2.2.2. <i>Objetivos</i> .....	16
3. Materiais e métodos.....	28
3.1. Local de realização do ensaio .....	28
3.2. Material Vegetal .....	29
3.2.1. <i>Genótipos</i> .....	29
3.3. Ferrugem .....	33
3.3.1. <i>Inoculação</i> .....	33
3.3.2. <i>Avaliação da evolução da ferrugem e quantificação da resistência em estufa</i> .....	38
3.3.3. <i>Avaliação da resistência de campo</i> .....	39
3.3.4. <i>Análise dos dados</i> .....	40
3.4. Precocidade .....	40
3.4.1. <i>Registo da fenologia</i> .....	40
3.4.2. <i>Medições biométricas</i> .....	41
3.4.3. <i>Grupos de Precocidade</i> .....	41
3.4.4. <i>Análise dos dados</i> .....	41
3.5. Cor .....	42

3.5.1. Coordenadas CIE .....	42
3.5.2. Análise dos dados .....	44
4. Resultados e discussão .....	45
4.1. Família 1: Ferrugem .....	45
<i>Seleção em estufa</i> .....	45
<i>Avaliação de Campo</i> .....	49
4.2. Família 2: Precocidade.....	50
<i>Grupos de Precocidade e GDC</i> .....	50
<i>Parâmetros biométricos</i> .....	52
4.3. Família 3: Cor do Fruto .....	55
5. Conclusões e perspectivas.....	61
6. Referências .....	A
7. Anexos .....	L
7.1. Anexo I.....	L
7.2. Anexo II.....	N
7.3. Anexo III.....	P
7.4. Anexo IV .....	Q

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Distribuição da densidade das raízes de framboesa em profundidade (a); lançamento de planta de framboesa (b); fruto de framboesa (c). Adaptado de Funt (2013). .	6
<b>Figura 2</b> – Esquema do ciclo biológico das variedades de framboesa não-remontantes (a) e remontantes (b). Adaptado de (Carew et al., 2000a).....	8
<b>Figura 3</b> – Esquema geral de melhoramento de cultivares clonais. Adaptado de Brown et al. (2014).....	13
<b>Figura 4</b> – Página inferior de folha de framboeseira coberta com lesões esporulantes de <i>T. americana</i> (a); manchas cloróticas na página superior de folhas de framboeseira, provocadas pela infeção por <i>T. americana</i> (b); framboesa madura com lesões esporulantes de <i>T. americana</i> (c); framboesas imaturas com lesões esporulantes de <i>T. americana</i> (d); aglomerado de esporos de <i>T. americana</i> na página inferior de uma folha de framboeseira (e); urediniósporos de <i>T. americana</i> vistos ao microscópio, com uma ampliação de 1000x (f,g). As quatro fotos da série de cima foram registadas no PIF, em agosto de 2022.....	18
<b>Figura 5</b> – Localização geográfica do concelho de Odemira em Portugal Continental. ....	28
<b>Figura 6</b> – Planta (a) e frutos (b) do PF, instalado no PIF. ....	29
<b>Figura 7</b> – Planta do PM1, instalado no PIF.....	30
<b>Figura 8</b> – Planta (a) e frutos (b) do PM3, instalado no PIF. ....	31
<b>Figura 9</b> – Plântulas de framboesa germinadas prontas para transplantação, em cuvetes de germinação na câmara de fito-clima (a); plântulas de framboesa transplantadas para tabuleiros de alvéolos de 130 mL (b).....	32
<b>Figura 10</b> – Túnel de polietileno instalado no PIF (a); pormenor de duas linhas com plantas de framboesa instaladas, dentro do túnel (b); distribuição espacial da Fam1 (cor de laranja), da Fam2 (verde) e da Fam3 (cor-de-rosa) nas baterias (c, a figura não está à escala). ....	33
<b>Figura 11</b> – Sintomas provocados por ferrugem tardia nas páginas superior (a, c, d) e inferior (b, e) das folhas de framboeseira utilizadas para colheita de esporos.....	34
<b>Figura 12</b> – Hemocitómetro composto pelos poços (1) e grelhas (2) (a); pormenor da grelha constante do hemocitómetro e representação dos diversos quadrantes (b); esporos de <i>T. americana</i> na secção A da grelha do hemocitómetro, vistos ao microscópio com uma ampliação de 400x (c). ....	35
<b>Figura 13</b> – Esporos germinados e não germinados de <i>T. americana</i> , vistos ao microscópio com uma ampliação de 400x (a); pormenor de um esporo germinado com o conteúdo celular movimentado para o tubo germinativo, visto ao microscópio com uma ampliação de 1000x (b). ....	37

<b>Figura 14</b> – Tubo com esporos de <i>T. americana</i> submerso num gobelé, em banho de 40 °C (a); esporos descongelados em placa de Petri com disco de papel de filtro hidratado (b). ...	38
<b>Figura 15</b> – Análise da área lesionada de uma folha de framboeseira inoculada com <i>T. americana</i> , através do software ImageJ (versão 1.53). .....	38
<b>Figura 16</b> – Medição da cor de frutos de framboesa com colorímetro portátil Chroma-Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Americas Inc.) (a); mostrador com o valor das coordenadas medidas (b); espaço tridimensional formado pelos 3 eixos formulados pelo CIE (c) (Ly et al., 2020). .....	43
<b>Figura 17</b> – Relação entre a severidade das plantas de framboesa inoculadas e a respetiva data de inoculação. Todas as datas reportam ao ano de 2022. ....	47
<b>Figura 18</b> – Média da severidade medida para as três famílias e para os dois progenitores da Fam1 (PF e PM1). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ( $p < 0,05$ ). .....	49
<b>Figura 19</b> – Número de plantas em cada grupo de precocidade e peso relativo de cada um no número total de indivíduos da Fam2. ....	51
<b>Figura 20</b> – Gráfico de dispersão dos valores médios por planta ( $n=9$ ) no eixo amarelo-azul ( $b^*$ ) em função dos valores no eixo vermelho-verde ( $a^*$ ) das 95 plantas avaliadas da Fam3, do PF e do PM3. ....	55
<b>Figura 21</b> – Gráfico de dispersão dos valores médios por planta ( $n=9$ ) de luminosidade ( $L^*$ ) em função dos valores de tonalidade ( $h^\circ$ ) das 95 plantas avaliadas da Fam3, do PF e do PM3. Ângulos de $0^\circ$ ou próximos de $0^\circ$ correspondem a tonalidades entre roxo e vermelho; $90^\circ$ correspondem a amarelo; $180^\circ$ a verde-azulado; $270^\circ$ a azul (McGuire, 1992). ....	56
<b>Figura 22</b> – Relação entre a tonalidade visualmente percecionada e o respetivo valor do ângulo de tonalidade ( $h^\circ$ ) (a, Fonte: <a href="http://graphicdesign.stackexchange.com">graphicdesign.stackexchange.com</a> ); representação do espaço tridimensional formado pela luminosidade (eixo vertical central), cromaticidade (afastamento horizontal ao eixo central de luminosidade) e tonalidade (valor do ângulo em cada plano horizontal) (b, Fonte: <a href="http://www.pngwing.com">www.pngwing.com</a> ). ....	58
<b>Figura 23</b> – Exemplar de folha representativa de um nível de infeção de ferrugem tardia correspondente a 1. ....	L
<b>Figura 24</b> - Exemplar de folha representativa de um nível de infeção de ferrugem tardia correspondente a 2. ....	L
<b>Figura 25</b> - Exemplar de folha representativa de um nível de infeção de ferrugem tardia correspondente a 3. ....	M
<b>Figura 26</b> – Ápice no estado vegetativo. ....	N

<b>Figura 27</b> – Estados fenológicos do gomo terminal classificados como botão, compreendidos entre esta classe e a classe de queda da pétala. ....	N
<b>Figura 28</b> – Estados fenológicos do gomo terminal classificados como queda da pétala (imagem acima à esquerda), compreendidos entre esta classe e a classe colheita. ....	O
<b>Figura 29</b> – Estado fenológico correspondente a colheita.....	O
<b>Figura 30</b> – Valores de temperatura máxima e mínima do ar, para o mês de abril, no distrito de Lisboa .....	P
<b>Figura 31</b> – Valores de temperatura máxima e mínima do ar, para o mês de maio, no distrito de Lisboa .....	P
<b>Figura 32</b> – Valores de temperatura média (T_MED), máxima (T_MAX) e mínima (T_MIN) registados pela estação meteorológica de Odemira-São Teotónio, durante os meses de abril e maio de 2022.....	Q

## Índice de quadros

<b>Quadro 1</b> – Datas de instalação das plantas das três famílias, no PIF, durante o ano de 2022. .....	33
<b>Quadro 2</b> – Classificação de resistência/suscetibilidade de plantas de framboesa em função da severidade nas respectivas folhas inoculadas.....	39
<b>Quadro 3</b> – Datas de plantação dos indivíduos da Fam2 e respetiva data da última monitorização, efetuada 130 dias após aquela.....	40
<b>Quadro 4</b> – Categorização do número total de plantas inoculadas e respetivo valor de severidade média (SM, %), severidade mínima (Smin, %) e severidade máxima (Smax, %). .....	45
<b>Quadro 5</b> – Valores de viabilidade dos esporos (%) de <i>T. americana</i> utilizados na inoculação das plantas de framboesa nas 7 datas. ....	47
<b>Quadro 6</b> – Grupos de precocidade de plantas de framboesa da Fam2 e respetiva data de plantação, colheita, duração em semanas e graus-dia de crescimento (GDC) calculados com TB5°C. Todas as datas reportam ao ano de 2022.....	50
<b>Quadro 7</b> – Correspondência dos grupos agregados aos grupos de precocidade originais e respetivos valores (médios no caso de grupos agregados) de dias, semanas e GDC (TB5°) desde a plantação até à colheita do king fruit.....	52
<b>Quadro 8</b> – Valores médios do comprimento total das plantas (CT, cm), comprimento desde a base até ao primeiro lateral produtivo (C1LP, cm), número de laterais produtivos (NLP) e da sua raiz quadrada (RQ NLP) de cada grupo de precocidade (GP), respetivo desvio padrão (DP, cm), ordem segundo a análise de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ , Rank) e grupos de separação de medianas.....	53
<b>Quadro 9</b> – Média por planta (n=9) dos valores de luminosidade (L*), escala vermelho-verde (a*), escala amarelo azul (b*), tonalidade (h°) e cromaticidade (C*) relativos a cinco indivíduos, ao PF e ao PM3, e distância das coordenadas de cada um ao PF ( $\Delta EiPF$ *).....	57

## Lista de acrónimos

<b>C1LP</b>	Comprimento desde a base até ao primeiro lateral produtivo
<b>CT</b>	Comprimento total da planta
<b>cv(s).</b>	Cultivar(es)
<b>Fam1</b>	Família 1
<b>Fam2</b>	Família 2
<b>Fam3</b>	Família 3
<b>GDC</b>	Graus-dia de crescimento
<b>HR</b>	Humidade Relativa
<b>INIAV</b>	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
<b>IPMA</b>	Instituto Português do Mar e da Atmosfera
<b>NLP</b>	Número de laterais produtivos
<b>PF</b>	Progenitor Feminino
<b>PIF</b>	Polo de Inovação da Fataca
<b>PM1</b>	Progenitor Masculino 1
<b>PM2</b>	Progenitor Masculino 2
<b>PM3</b>	Progenitor Masculino 3

# 1. Introdução

Tem-se assistido, nas últimas décadas, a um acentuado aumento na procura e consumo de framboesa e de frutos do género *Rubus* em geral, na Europa e noutros países do mundo. Tal deve-se, essencialmente, ao aumento da qualidade geral do fruto e da vida de prateleira, conseguida através da implementação de cadeias de frio no transporte e armazenamento para além da perceção, junto do consumidor, dos benefícios que o seu consumo traz para a saúde (Clark et al., 2007; Finn & Strik, 2015; Strik et al., 2007; Swanson et al., 2011).

A framboesa representa um valioso produto frutícola, com elevada atratividade, constituindo uma importante fonte de rendimento e de trabalho, por ser uma cultura bastante exigente em mão de obra para colheita para o mercado em fresco (Graham & Brennan, 2018). A seguir à comercialização em fresco, a principal forma de consumo é em frutos individuais congelados e processados em sumos (Moore, 2008).

Em 2021, os maiores produtores mundiais foram a Rússia, com quase 200 mil toneladas, o México, com aproximadamente 165 mil toneladas e a Sérvia e a Polónia, ambas com aproximadamente 110 mil toneladas. A Europa lidera a produção, com 602,1 mil toneladas numa área de 86,3 mil hectares, contabilizando 67,9% da produção mundial. A seguir à Sérvia e à Polónia, os principais produtores europeus são a Espanha, a Ucrânia e Portugal (FAO, 2022).

Apesar de ser uma cultura de produção relativamente recente em Portugal, também aqui a framboesa tem registado um aumento exponencial na área cultivada e na produção, ao longo da última década. Entre 2010 e 2021 verificou-se um aumento na área cultivada, que evoluiu de 146 para 1450 ha, e na produção, que teve um aumento exponencial de 2216 para 27950 toneladas, fazendo de Portugal o 5º maior produtor na Europa e o 8º maior produtor mundial de framboesa. A framboesa é um produto com forte orientação exportadora, apresentando saldos para a balança comercial francamente positivos. Os dados mais recentes reportam a 2020 com um saldo de 181,099 milhões de euros (GPP, 2022). Os principais destinos de exportação são os Países Baixos, Alemanha, França, Reino Unido e Espanha.

A produção de framboesa em Portugal beneficia das ótimas condições edafo-climáticas, da existência de variedades adaptadas a diferentes regiões, da procura crescente destes frutos num mercado não saturado e de estabilidade de comercialização sob a alçada de marcas com peso no mercado. As sofisticadas tecnologias de produção e elevada capacidade técnica dos produtores permitem a produção durante todo o ano, o que cria condições para o reforço do posicionamento em mercados-alvo (GPP, 2019).

A atratividade económica da framboesa, aliada ao facto de Portugal apresentar condições edafo-climáticas ideais para a sua produção e oferta durante todo o ano, fazem desta uma cultura extremamente atrativa, cuja produção se caracteriza por uma elevadíssima exigência

técnica e grau de inovação, num contexto de crescente exigência por parte dos consumidores e dos retalhistas, relativamente à qualidade e sustentabilidade da produção (GPP, 2019). Acresce também a diminuição da quantidade de pesticidas disponíveis para o controlo das ameaças bióticas que exercem pressão sobre a cultura, nomeadamente a doença da ferrugem, em Portugal. Estes fatores, aliados aos constrangimentos impostos pelas alterações climáticas, fazem com que seja urgente o desenvolvimento de genótipos resistentes e/ou tolerantes às pragas e doenças que exercem maior pressão sobre a cultura, de forma duradoura e estável (Graham & Brennan, 2018). Atualmente, não há cultivares (cvs.) que apresentem simultaneamente frutos de elevada qualidade e resistência ou tolerância a pragas e doenças (Jennings, 2018). É essencial a seleção e melhoramento de material vegetal de elevado rendimento, adaptado à região onde é produzido, com as características de interesse no mercado para o qual está orientado, de forma a maximizar a competitividade dos produtores e a rendibilidade da cultura.

Nesse sentido, o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), I.P., em parceria com a empresa BeiraBaga, implementou um programa de melhoramento de framboesa, que já selecionou um conjunto de genótipos com interesse agronómico, mas que ainda não possuem todas as características que façam deles variedades de excelência.

O trabalho realizado no âmbito desta dissertação insere-se numa fase inicial do programa de melhoramento, caracterizada pela avaliação de 4 mil genótipos por ano. O principal objetivo prendeu-se com a avaliação de três famílias de framboesa, originárias do cruzamento do mesmo progenitor feminino (PF) – que se pretende melhorar, com três progenitores masculinos distintos. O genótipo que constitui o PF apresenta qualidade do fruto economicamente interessante, mas possui também três características bastante desfavoráveis: elevada suscetibilidade à doença da ferrugem tardia, provocada pelo fungo *Thekopsora americana* (Farl.) Aime & McTaggart; produção bastante tardia e cor do fruto demasiado escura para o mercado de exportação. Assim, cada cruzamento teve como finalidade a introdução de uma característica específica: resistência à doença da ferrugem tardia (família 1); precocidade na produção (família 2); produção de frutos de coloração mais clara (família 3). Pretendeu-se com este trabalho avaliar a eficácia de introdução das características pretendidas em cada descendência e aplicar metodologias práticas de apoio à seleção de indivíduos de interesse, em linha com os objetivos de melhoramento definidos.

Neste contexto, os objetivos específicos desta dissertação são os seguintes:

- Desenvolver e otimizar o protocolo de inoculação artificial de plantas jovens de framboesa com urediniósporos de *T. americana* e avaliar, através deste método, as plantas inoculadas da família 1 relativamente à sua resistência;
- Acompanhar a fenologia e avaliar as datas de produção dos descendentes da família 2, de forma a identificar indivíduos mais precoces que o PF;

- Avaliar os diferentes parâmetros relacionados com a cor do fruto da descendência da família 3, com o objetivo de identificar frutos de coloração mais clara que os do PF.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. A cultura da framboesa

#### 2.1.1. Taxonomia

A framboesa pertence à família das Rosáceas e ao gênero *Rubus*, um dos mais diversos do reino vegetal, sendo constituído por aproximadamente 500 espécies altamente heterozigóticas, cujo nível de ploidia pode variar entre diploide e dodecaploide (Jennings, 1988; Meng & Finn, 2002; Oliveira, 2021). Este gênero divide-se em 12 subgêneros, nomeadamente o *Ideobatus*, aquele a que pertence a framboesa. Este subgênero ocorre nos cinco continentes, mas apresenta maior concentração no hemisfério Norte, particularmente na Ásia, Europa e América do Norte. As espécies que dele fazem parte distinguem-se entre si pela capacidade de separação entre o recetáculo e os frutos maduros (Graham & Jennings, 2009).

As espécies de framboesa de maior interesse comercial são a vermelha (*R. idaeus* L.) e a preta (*R. occidentalis* L.). A espécie *R. idaeus* L. divide-se ainda em duas subespécies: a europeia (*R. idaeus* L. subsp. *vulgatus* Arrhen) e a norte americana (*R. idaeus* L. subsp. *strigosus* Michx), das quais derivam a maioria das variedades cultivadas. Apesar de serem ecótipos da mesma espécie e ambas diploides, apresentam diferenças entre si, nomeadamente na morfologia (ao nível da inflorescência e forma do fruto) e na distribuição geográfica (Oliveira, 2021; Oliveira et al., 2007).

A subespécie europeia está distribuída desde o círculo polar até às montanhas do Cáucaso, na Ásia Menor. A subespécie norte americana, por outro lado, está presente na América do Norte e na Ásia de Leste (Oliveira et al., 2007).

#### 2.1.2. Morfologia

As raízes de framboesa compõem a parte perene da planta e são fasciculadas, superficiais (restringem-se aos primeiros 25 cm do solo) e apresentam uma espessura média de 3 - 4 mm (Oliveira, 2021; Oliveira et al., 2007). Colonizam o solo de forma assimétrica (Figura 1), apresentando maior densidade na zona de renovação dos lançamentos, que surgem anualmente de gomos radiculares ou de gomos dormentes da base dos lançamentos (Hudson, 1959).

As folhas de framboesa são glabras, compostas, com elevada concentração de estomas na página inferior e ausência na página superior. Apresentam três folíolos quando jovens e em ramos frutíferos, e cinco quando adultas. A sua forma varia muito com as variedades (Oliveira et al., 2007). Os caules apresentam forma cilíndrica, podendo ser lisos ou revestidos de pêlos e acúleos, características importantes na suscetibilidade a algumas doenças

(Oliveira et al., 2007). Os entrenós alongam a uma taxa variável consoante a variedade e as condições de crescimento, e o número de nós varia com o ritmo de crescimento: a base e o terço superior apresentam maior densidade de nós, uma vez que se desenvolveram em períodos menos favoráveis (crescimento lento) e, pelo contrário, a zona intermédia do caule apresenta menos nós, uma vez que se desenvolveu a uma taxa de crescimento rápida, num período mais favorável (Oliveira et al., 2007). Cada nó apresenta, geralmente, um gomo axilar, potencialmente frutífero, que se forma no primeiro ano de desenvolvimento e dá origem a ramos frutíferos no ano seguinte (Jennings, 1988; Oliveira et al., 2007).

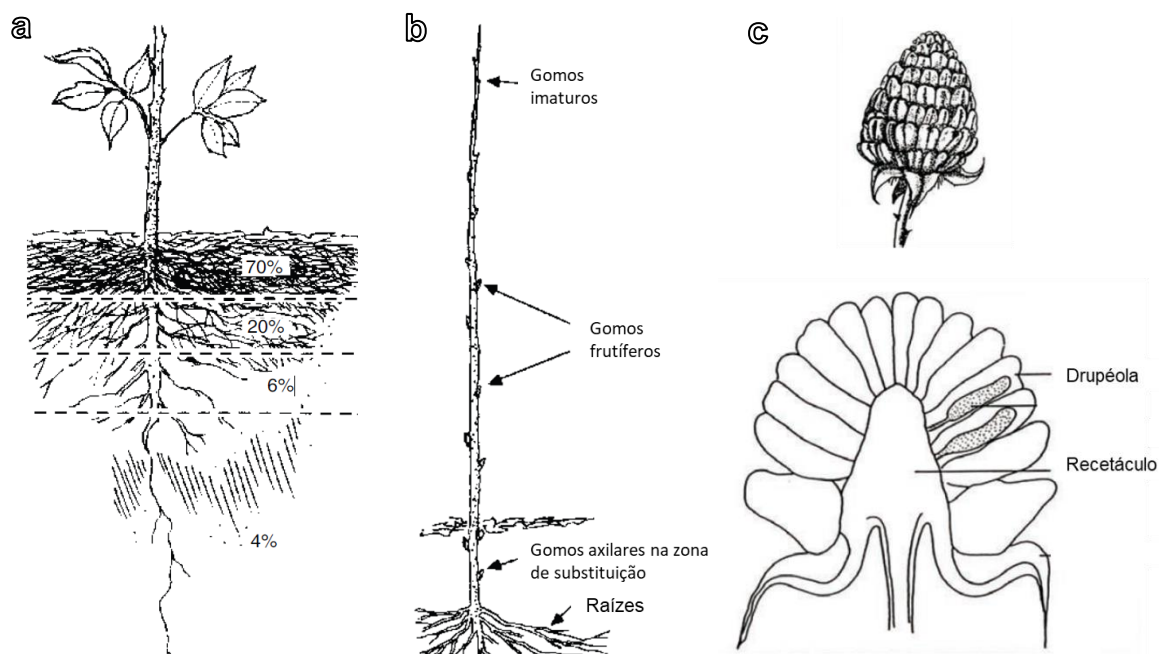
Os ramos frutíferos consistem num eixo desenvolvido a partir dos gomos laterais dormentes do ano anterior, que desenvolve no seu ápice primórdios florais. Da sua axila, desenvolvem-se eixos secundários que originam novas flores. Estes ramos apresentam maior comprimento e quantidade de nós quando localizados na base do lançamento, sendo estas características influenciadas por outros fatores como as práticas culturais, as condições ambientais e a idade da planta (Oliveira et al., 2007; Williams, 1959). O número de frutos por ramo é influenciado pelo número de flores do ramo e a sua taxa de vingamento (Oliveira et al., 2007).

A floração de *R. idaeus* inicia-se no ápice do ramo frutífero e evolui progressivamente em direção à base do eixo. As flores agrupam-se em inflorescências cimeiras, numa quantidade que pode variar entre 3 e 75 flores por inflorescência (Halevy, 1986). As flores são hermafroditas, pequenas (0,5 - 2,5 cm), com um cálice formado por cinco sépalas e uma corola com cinco pétalas, geralmente brancas. Possuem um hipanto curto e um gineceu apocárpico, constituído por 60-80 ovários geralmente monospermiados, agrupados num receptáculo carnudo coniforme. Inseridos no cálice, encontram-se anéis de estames, entre 60 e 90, que envolvem o receptáculo com os carpelos. As flores produzem elevadas quantidades de néctar (13 mg durante a fase de floração) que, em conjunto com o pólen, atrai de forma muito eficaz insetos polinizadores, particularmente a abelha doméstica, o polinizador principal. Cada ovário dá origem a uma drupéola<sup>1</sup>, monospermiada, de mesocarpo carnudo e endocarpo rijo, envolvendo a semente. As drupéolas agrupam-se num fruto múltiplo de drupas, agregadas por pêlos microscópicos – a framboesa (Figura 1) (Graham & Jennings, 2009; Oliveira et al., 2007).

Durante a maturação do fruto forma-se uma camada de abscisão entre as drupéolas e o receptáculo, permitindo que o fruto se separe do mesmo durante a colheita (Oliveira et al., 2007).

---

<sup>1</sup> Drupa de pequena dimensão que se desenvolve a partir de um ovário.



**Figura 1** – Distribuição da densidade das raízes de framboesa em profundidade (a); lançamento de planta de framboesa (b); fruto de framboesa (c). Adaptado de Funt (2013).

### 2.1.3. Ciclo cultural

Para descrever o ciclo cultural da framboesa de forma mais precisa, é importante fazer a distinção entre framboesas remontantes e não remontantes.

#### 2.1.3.1. Característica remontante

Esta característica, na cultura da framboesa, está relacionada com os hábitos de frutificação das variedades, exercendo elevada influência sobre as técnicas culturais aplicadas e a sua época de produção (Oliveira, 2021).

O ciclo das variedades não-remontantes é bienal, sendo que estas apenas frutificam em lançamentos de segundo ano, após dormência invernal. Pelo contrário, as variedades remontantes têm a capacidade de frutificar tanto em lançamentos do ano, sem dormência invernal, como em lançamentos do segundo ano, após dormência invernal (Figura 2). Assim, os seus ciclos culturais apresentam algumas diferenças, bem como as suas exigências climáticas (Oliveira, 2021).

#### 2.1.3.2. Crescimento vegetativo

Esta fase decorre de forma semelhante para ambos os tipos de variedades.

O início do desenvolvimento vegetativo dá-se quando os gomos do sistema radicular, que podem ser gomos radiculares ou gomos axilares dos lançamentos na zona de substituição (Figura 1), começam a emitir novos lançamentos (Oliveira et al., 2007).

O abrolhamento dos gomos radiculares pode originar lançamentos de outono ou de primavera, consoante a época em que acontece (Hudson, 1954; Williams, 1959). Os gomos axilares nunca ficam completamente dormentes, ao contrário dos radiculares, e dão origem, anualmente, aos lançamentos de reposição na primavera (Oliveira et al., 2007).

Ambos podem originar lançamentos durante toda a época de crescimento, com uma elevada capacidade de colonização do espaço disponível, conduzindo à formação de tufos densos (Oliveira et al., 2007). O desenvolvimento vegetativo estende-se desde a primavera até ao final do outono, altura em que a planta entra em dormência invernal (Carew et al., 2000a).

Durante o primeiro ano dá-se o crescimento vegetativo, que cessa com a entrada em dormência no outono, com a diminuição da temperatura e do fotoperíodo (Oliveira, 2021).

#### *2.1.3.3. Desenvolvimento reprodutivo em variedades não-remontantes (floricanes)*

O desenvolvimento reprodutivo inicia-se com a indução floral dos gomos e do meristema apical dos lançamentos do ano. Durante este processo ocorre, regida por fenómenos bioquímicos, a alteração qualitativa dos gomos, da função vegetativa para reprodutiva, fazendo com que sejam capazes de diferenciar flores. Ocorre no outono, imediatamente antes da paragem de crescimento para a entrada em dormência no inverno (Darnell et al., 2002; Oliveira, 2021; Oliveira et al., 2007).

A fase seguinte corresponde à diferenciação floral, que consiste na formação de primórdios florais nos gomos laterais e meristema apical e, segundo Oliveira et al. (2007), pode ocorrer, ou não, imediatamente a seguir à indução floral, dependendo da variedade. Esta é interrompida em novembro e retomada em janeiro/fevereiro.

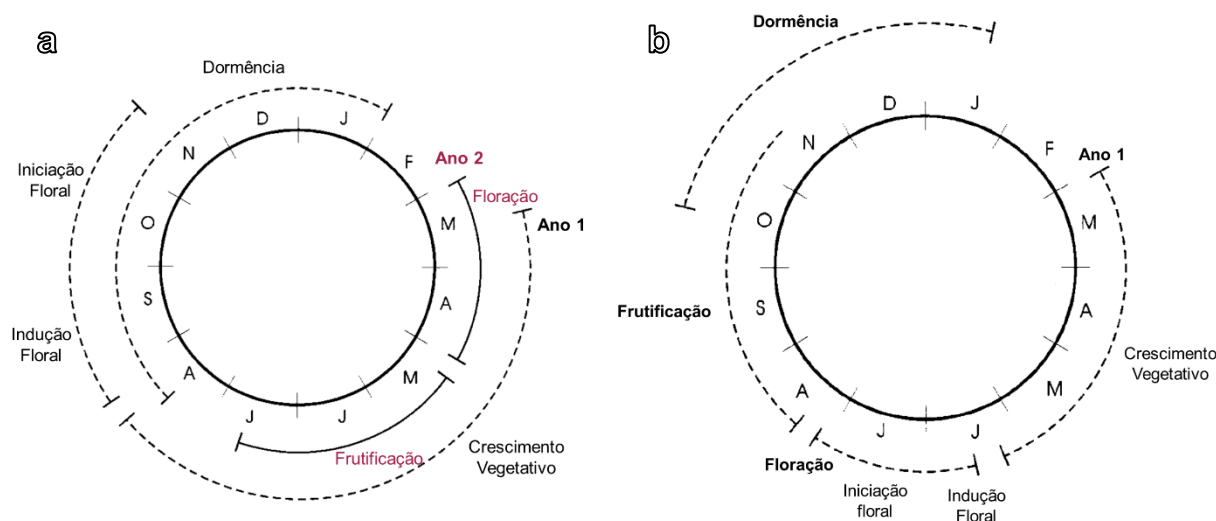
Para que haja quebra de dormência e abrolhamento dos gomos, as variedades não-remontantes necessitam de acumular 800 a 1600 horas de frio (temperatura inferior a 7,2°C). Este é um fator de elevada influência na diferenciação floral e na formação de ramos frutíferos, o que, conseqüentemente, afeta a produção final da planta (Oliveira, 2021).

A floração inicia-se na primavera, com o abrolhamento dos gomos devido ao aumento da temperatura, podendo ocorrer em março ou abril, simultaneamente com o início do desenvolvimento vegetativo desse ano. Em maio, inicia-se o desenvolvimento do fruto, cuja maturação se dá no final de julho, aproximadamente (Carew et al., 2000a).

#### *2.1.3.4. Desenvolvimento reprodutivo em variedades remontantes (primocanes)*

Os lançamentos das variedades remontantes têm a capacidade de produzir duas vezes durante o ciclo biológico: a primeira, no primeiro ano, nos gomos da porção superior dos lançamentos (geralmente nos primeiros 15 nós, sendo este um valor que varia com a variedade) (Heide & Sønsteby, 2011; Oliveira et al., 2007); a segunda, na porção inferior do lançamento, no segundo ano. Ao contrário das variedades não-remontantes, a primeira

floração ocorre de forma indiferente ao fotoperíodo e às baixas temperaturas, não necessitando do período de dormência. A iniciação floral ocorre simultaneamente com o período de desenvolvimento vegetativo, no início da primavera, com a indução e diferenciação floral, culminando na frutificação e maturação dos frutos entre o final do verão e o início do outono (Capela, 2020; Oliveira, 2021).



**Figura 2** – Esquema do ciclo biológico das variedades de framboesa não-remontantes (a) e remontantes (b). Adaptado de Carew et al. (2000a).

Os lançamentos de segundo ano necessitam apenas de 800 horas de frio para que o abrolhamento e frutificação ocorram de forma satisfatória, o que torna estas variedades mais apropriadas para cultivo nos países do sul da Europa, que apresentam invernos mais amenos (Oliveira, 2021). O desenvolvimento floral, frutificação e maturação do segundo ano ocorrem de forma semelhante à das variedades não-remontantes.

#### 2.1.4. Exigências edafo-climáticas

No respeitante às exigências edáficas, por possuir um sistema radicular bastante superficial e sensível ao encharcamento, a cultura da framboesa requer solos de textura arenosa ou arenosa-franca, não muito profundos. Estes devem apresentar um pH ótimo entre 6 e 6,5, ser bem drenados e ricos em matéria orgânica (2 - 4%) (Edin et al., 1999; Harvey & Sobey, 2013; Oliveira, 2021).

A cultura de framboesa está adaptada a climas temperados, caracterizados por invernos amenos (que ainda assim cumpram as suas necessidades em frio) e verões suaves. A costa atlântica portuguesa, particularmente a região do sudoeste alentejano, reúne as condições ideais para a sua produção, sendo-lhe atribuída a classificação climática Csb, segundo a

classificação de Köppen-Geiger, correspondente a clima temperado com verão ameno e seco (Peel et al., 2007; (Oliveira, 2021). A framboesa atinge o potencial máximo de desenvolvimento vegetativo a uma temperatura ótima de 20 °C, apresentando uma diminuição de desempenho com temperaturas superiores a 30 °C, que se agrava se em simultâneo se verificarem valores de humidade relativa (HR) baixos e vento (Oliveira, 2021). Heide & Sønsteby (2011) concluem que, nas variedades não-remontantes, a arquitetura ótima que gera máxima produção é obtida com uma temperatura de verão adequada para o desenvolvimento de lançamentos vigorosos, sucedida pela exposição a baixas temperaturas e fotoperíodos curtos – valor crítico de 15 horas para temperaturas intermédias de 15 °C - para correta iniciação floral e indução de dormência dos gomos, bem como exposição ao período de frio adequado para quebra de dormência, como referido na secção 2.1.3. Para as variedades remontantes, os autores referem que, para obter plantas com maior densidade de ramos laterais, bem como floração e frutificação mais abundantes, é importante que se verifiquem temperaturas mais elevadas ao longo do ciclo, entre os 20 e os 25 °C, que promovem também uma maturação mais precoce na maioria das variedades.

## **2.2. Melhoramento**

Os primeiros registos de formas cultivadas de framboesa remontam a meados do século XIV, na Europa, sendo que apenas no final do século XVIII são reportadas variedades primárias distintas da cultura, obtidas essencialmente por hibridação. O melhoramento controlado de framboesa teve início na década de 20 do século XX, permitindo que, entre 1981 e 2001, fossem lançadas 100 novas variedades (Moore, 2008). Impulsionados pelo aumento acentuado da procura de framboesa no mercado, vários programas de melhoramento – públicos e, principalmente, privados, foram estabelecidos e têm vindo a produzir variedades de excelência, maioritariamente nas últimas duas décadas (Graham & Brennan, 2018; Oliveira, 2021).

Existem dois polos principais de melhoramento da cultura da framboesa: o europeu e o norte americano (Oliveira et al., 2007).

Na Europa, é de realçar um dos programas de melhoramento mais profícuos, o *East Malling Research* (EMR), no Reino Unido, responsável por duas séries de cultivares de elevada importância no mercado e nos programas de melhoramento: a série 'Malling' e a série 'Autumn' (Jennings, 2018). As primeiras cultivares da série 'Malling' foram lançadas em 1950, tendo desde então sido introduzidas no mercado, provenientes desta série, cultivares não-remontantes de floração tardia e precoce (Jennings, 1988; Knight & Fernández, 2008). Na década de 80 do século XX, fruto da ênfase na seleção de cultivares remontantes, é lançada a cv. Autumn Bliss, precoce, que impulsionou o desenvolvimento de cultivares remontantes e disponibilizou material genético para vários programas de melhoramento em todo o mundo

(Jennings, 2018). Mais tarde, foi selecionada a cv. Autumn Treasure, também remontante e apresentando simultaneamente tolerância às infecções pelos fungos do género *Phytophthora* e frutos de elevada qualidade (Jennings et al., 2016). A série 'Glen', desenvolvida pelo *Scottish Crop Research Institute* (SCRI), compreende também cultivares não-remontantes relevantes na indústria da framboesa. Estas apresentavam melhorias significativas no tamanho e propriedades organolépticas do fruto, bem como ausência de espinhos que, aliada a um hábito de crescimento vertical e facilidade de separação entre o fruto e o recetáculo, as tornava adequadas para colheita mecânica (Jennings, 2018). A cv. Glen Ample revela-se como a de maior sucesso desta série, lançada em 1996, adotada como *standard* no mercado de retalho europeu, apropriada tanto para processamento como para venda em fresco (Jennings, 2018).

Na Europa central, o programa de melhoramento do Instituto de Horticultura da Polónia, um dos maiores produtores europeus, desenvolveu também algumas cultivares remontantes de relevo no mercado, como a 'Polana' e a 'Polka' (Jennings, 2018). Há ainda vários programas públicos de melhoramento em países como a Itália, Espanha, Sérvia, Hungria, Roménia, Ucrânia e Rússia (Oliveira, 2021).

Na América do Norte, destacam-se os programas de melhoramento nos Estados Unidos, um dos maiores produtores mundiais de framboesa, em Washington e no Oregon, na costa oeste, cujos esforços se concentram na seleção de cultivares remontantes adaptadas a colheita mecânica e processamento, tendo conseguido obter cultivares tolerantes à podridão radicular (grupo 'Cascade') e imunes ao *Raspberry Bushy Dwarf Virus* (RBDV) ('Cascade Dawn') (Moore, 2004, 2006; Moore & Finn, 2007); em Nova Iorque e Nova Hampshire, na costa este, o programa de melhoramento mais antigo, que data do início de 1800, que lançou, em 1969, uma cultivar remontante de excelência, a 'Heritage', que foi uma das mais cultivadas no mundo e sobre a qual assenta o melhoramento de cultivares remontantes (Daubeny, 1997; Oliveira et al., 2007); o programa da *Agriculture and Agri-Food* do Canadá (AAFC), responsável pelo lançamento da cv. Tulameen, em 1989, uma das mais populares a nível mundial e a referência no que diz respeito ao sabor de frutos para venda no mercado em fresco (Jennings, 2018).

O melhoramento de cultivares remontantes revolucionou a produção de framboesa, tendo estas passado a dominar a produção em regiões em que as rígidas temperaturas inverniais causam acentuados danos nas culturas e, pelo contrário, em regiões onde não se verificam os requisitos em frio necessários para a quebra de dormência e produtividades aceitáveis (Jennings, 2018). É de realçar a importância que o programa de melhoramento privado da multinacional *Driscoll's* (DAS), sediada nos Estados Unidos, cujo âmbito está centrado no desenvolvimento de cultivares remontantes ('Driscoll Maravilla') e sistemas de produção melhor adaptados à sua produção, teve na adoção do mesmo modelo de negócio por vários programas de melhoramento privados. Novas cultivares para produção em regime de exclusividade e com licença restrita foram lançadas no Reino Unido ('Sapphire', 'Jade'),

Países Baixos ('Kweli', 'Kwanza'), França ('Paris', 'Versaille') e Espanha ('Lupita' e 'Adelita', cultivadas em Marrocos para fornecer o mercado europeu durante o inverno) (Jennings, 2018).

Em Portugal, está em curso um programa de melhoramento em framboesa, resultante da parceria entre o INIAV, I.P. e a empresa BeiraBaga, que se dedica à produção e comercialização de pequenos frutos. A maioria das cultivares em produção comercial em Portugal foi obtida por programas de melhoramento de empresas privadas, estando-lhes inerente a obrigatoriedade de produção em exclusividade e o pagamento de uma percentagem do lucro sobre a produção final (Oliveira, 2021). Segundo Oliveira (2021), as cultivares com maior expressão de área em Portugal são as remontantes pertencentes ao grupo *Driscoll's* (DAS), como a 'Maravilla', à empresa holandesa *Advance Berry Breeding* (ABB), como a 'Kweli' e a 'Kwanza', e não-remontantes, como a 'Sapphire'<sup>TM</sup>, pertencente ao grupo *BerryWorld*, do Reino Unido.

A expansão do género *Rubus* no geral, e da framboesa em particular, está limitada pelas alterações climáticas, pelos fatores de stress biótico e abiótico e pela necessidade de implementação de práticas de produção sustentáveis. A longevidade e viabilidade da cultura nas explorações é fortemente condicionada pela pressão exercida pelas pragas e doenças e pela biologia da planta (Graham & Brennan, 2018). Atualmente, a indústria baseia a produção num número restrito de variedades, preferidas pelo consumidor e pelo retalho devido à elevada qualidade do fruto, mas que, no geral, apresentam baixa ou ausência de resistência aos fatores bióticos mais problemáticos. Com a diminuição da quantidade de pesticidas disponíveis para o seu controlo e com o aumento da exigência e preocupação por parte do consumidor relativamente à sustentabilidade da produção, aliado aos constrangimentos impostos pelas alterações climáticas, é urgente o desenvolvimento de génotipos resistentes e/ou tolerantes às pragas e doenças que exercem maior pressão sobre a cultura, de forma duradoura e estável (Graham & Brennan, 2018). Acresce ainda a esta necessidade, a dificuldade associada ao facto de as cultivares modernas estarem separadas dos antecessores selvagens por apenas algumas gerações, cuja domesticação reduziu em grande extensão a diversidade genética e morfológica. Graham & McNicol (1995) reportam uma similaridade genética de 70% entre as cultivares europeias.

### **2.2.1. Técnicas de melhoramento**

Todos os programas de melhoramento são implementados de acordo com um determinado esquema de melhoramento, que varia em função da cultura e tipo de cultivar, e que determina a passagem das linhas de melhoramento ao longo do processo de seleção (Brown et al., 2014). As cultivares de framboesa são consideradas clonais, tal como as de

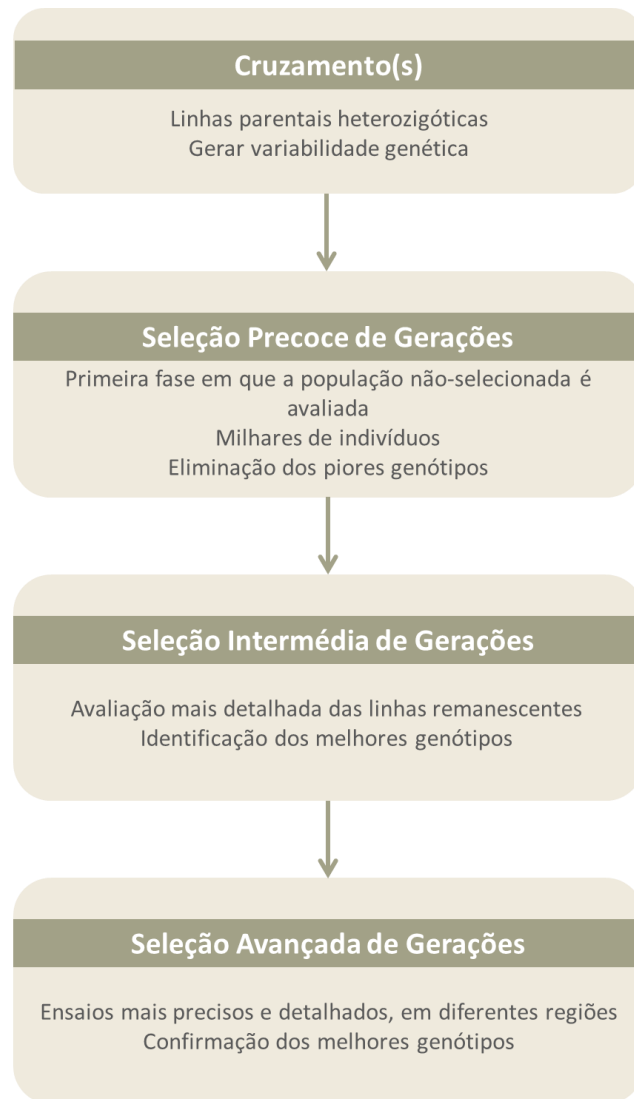
espécies frutícolas perenes (maçã, pêra, laranja, ameixa, entre muitas outras) e outras culturas cultivadas como anuais (como a batata). Este tipo de cultivares tem origem na propagação vegetativa de linhas de melhoramento, fazendo com que sejam geneticamente uniformes (Brown et al., 2014).

A estratégia tipicamente empregue nos esquemas de melhoramento de framboesa é semelhante àquela utilizada para outras culturas propagadas vegetativamente (Hall et al., 2009).

O método correntemente utilizado na maioria dos programas de melhoramento de framboesa é o clássico, que assenta nos processos base de cruzamento e seleção. Devido às características intrínsecas da espécie e aos sistemas de condução tradicionalmente utilizados, um programa de melhoramento de framboesa demora em média 8 a 10 gerações, desde a avaliação das plântulas originárias dos primeiros cruzamentos em condições de campo até ao lançamento de uma nova cultivar (Brown et al., 2014; Gambardella et al., 2016). Segundo Brown et al. (2014), o processo de desenvolvimento de uma cultivar clonal é relativamente simples, estando a seleção dividida em 3 fases principais, tal como esquematizado na Figura 3.

O processo inicia-se com o cruzamento dos progenitores selecionados, que exibem determinada característica de interesse. A maioria das linhas parentais utilizada no melhoramento de cultivares clonais é altamente heterozigótica, o que significa que é possível observar segregação imediatamente na primeira geração de descendentes (Brown et al., 2014; Caligari & Brown, 2003). Segundo Hall et al. (2009), na maioria dos programas de melhoramento de framboesa, a seleção de progenitores baseia-se apenas na sua resposta fenotípica ao ambiente onde ocorrerá a seleção; os cruzamentos são feitos entre progenitores com base na manifestação de características desejáveis; muitos dos programas de melhoramento do mundo não usam planos de cruzamento ou ensaios estatisticamente delineados para a instalação das plântulas, nem são, tão pouco, registados dados suficientes para avaliar os padrões de transmissão das características de interesse. Estas práticas não são as ideais, mas são, muitas vezes, as passíveis de ser concretizadas.

As sementes produzidas pela linha parental utilizada como progenitor feminino são germinadas e, tendo atingido o porte adequado, são transferidas e transplantadas para o campo, no local onde serão avaliadas.



**Figura 3** – Esquema geral de melhoramento de cultivares clonais. Adaptado de Brown et al. (2014).

A primeira fase de seleção consiste na avaliação dos milhares de genótipos que resultam dos cruzamentos iniciais. Conjuntamente com as etapas anteriormente descritas, esta insere-se no primeiro ano do esquema de melhoramento. Por ser necessário avaliar milhares de genótipos nesta fase, é mantida, geralmente, apenas uma planta de cada um, não sendo possível ou exequível instalar ensaios mais sofisticados, com maiores unidades experimentais e réplicas. A avaliação é feita de forma relativamente grosseira, na maioria dos casos com recurso à análise visual e à medição de alguns indicadores com metodologias empregues de forma expedita. São eliminadas as plantas com fenótipos claramente desinteressantes para os objetivos delineados e mantidas as plantas dos genótipos que manifestem fenotipicamente as características de interesse. É refinado o número de genótipos individuais de interesse e aumentado o nível de precisão na avaliação do seu potencial para o desenvolvimento de uma nova cultivar (Brown et al., 2014).

Este tipo de metodologia empregue na fase inicial apresenta algumas limitações: as populações avaliadas são geralmente compostas por genótipos altamente heterozigóticos, onde os efeitos de dominância podem ser elevados e mascarar o verdadeiro genótipo da seleção; por ser subjetiva, a seleção com base na avaliação visual tende a ser mais ineficiente quando efetuada por apenas um melhorador; a seleção tende para caracteres com elevada heritabilidade, nomeadamente aquelas que são controladas por um único gene maior (Brown et al., 2014). Para garantir seleções mais objetivas, deverão ser medidos indicadores específicos para as características de interesse. É importante realçar, no entanto, que avaliações mais precisas nesta fase implicam acesso a recursos humanos, de espaço e financeiros, que raramente estão disponíveis (Brown et al., 2014; Caligari & Brown, 2003).

A fase intermédia de seleção poderá ser composta por aproximadamente 4 ciclos de seleção e decorrer ao longo de 4 anos. As linhas de melhoramento selecionadas são multiplicadas vegetativamente e são instalados ensaios de maior dimensão e complexidade, com unidades experimentais maiores bem como réplicas, culminando num ensaio de média escala. Este tem o objetivo de avaliar um número muito reduzido de genótipos e selecionar apenas um. Estes ensaios caracterizam-se por uma maior precisão, detalhe e objetividade de avaliação, sendo medidos vários indicadores relevantes para as características de interesse (Brown et al., 2014).

A porção final do programa de melhoramento divide-se em 3 etapas. Primeiramente, na fase de seleção avançada, é instalado um ensaio comercial com 8000 a 9000 plantas do genótipo selecionado, em diferentes regiões. Neste ensaio são realizados testes de aptidão à variedade, com o objetivo de avaliar a sua performance agronómica, a expressão das características de interesse e o grau de interação entre genótipo e ambiente. Desta avaliação resulta a seleção avançada do genótipo com a melhor performance.

No final das fases de seleção intermédia e avançada, os indivíduos selecionados poderão expressar a característica de interesse a um nível satisfatório, mas ter uma performance agronómica insatisfatória. Neste caso, poderá recorrer-se à realização de retrocruzamentos.

O retrocruzamento é uma técnica de melhoramento de plantas, mais comumente utilizada quando há cruzamentos interespecíficos e intergenéricos e, particularmente, na introdução de resistência a doenças em determinado genótipo agronomicamente superior (Brown et al., 2014; Langridge et al., 2003). Realizar um retrocruzamento consiste em cruzar um indivíduo com um dos seus progenitores (Langridge et al., 2003). No cruzamento inicial, há um progenitor que é dador da característica de interesse, a linha paterna, que possui características agronómicas desinteressantes – como baixo rendimento e fraca qualidade dos frutos –, e o progenitor recorrente, a linha materna, agronomicamente interessante, em cujo genótipo se quer introduzir a característica de interesse e que é sucessivamente cruzado com a descendência (Hasan et al., 2015). A quantidade de ciclos necessária para que os descendentes voltem a atingir um nível agronómico desejável, semelhante ao da linha

materna, varia com o tipo de técnica utilizada – convencional ou com marcadores moleculares – e com o tipo de alelos que se quer transmitir – dominantes ou recessivos (Hasan et al., 2015; Vogel, 2009). Esta técnica foi proposta pela primeira vez por Harlan e Pope, em 1922, e tem sido amplamente utilizada no melhoramento de diferentes culturas, com vários casos de sucesso (Allard, 1999; Hospital, 2005; Langridge et al., 2003; Stoskopf et al., 1993).

Quando for atingida a qualidade e performance satisfatórias ao longo destas duas fases de seleção, o genótipo originário do ensaio de seleção avançada, candidato a ser classificado como nova variedade, é submetido a testes de distinção, homogeneidade e estabilidade (DHE), durante 2 anos, pelo organismo europeu competente – o *Community Plant Variety Office* (CPVO). Se demonstrar resultados satisfatórios para os três requisitos, será registado e patenteado como nova variedade, passível de ser comercializável e produzida comercialmente.

### *Tipo de características a transmitir*

As características que se pretende transmitir à descendência e, em última instância, à variedade selecionada, podem ser de dois tipos: qualitativas ou quantitativas. O conhecimento básico relativamente aos mecanismos genéticos que regem a passagem das características de interesse dos progenitores para a descendência é essencial para a implementação de um esquema de melhoramento eficaz e eficiente (Brown et al., 2014; Hall et al., 2009).

As características qualitativas são controladas pela ação de um único gene maior – características de controlo monogénico – o que resulta numa expressão fenotípica geralmente de natureza binária e cujos fenótipos são relativamente fáceis de associar ao respetivo genótipo (Simmonds & Arthur, 2003). No entanto, a maioria das características de interesse que constituem objeto de seleção num programa de melhoramento não são qualitativas. Exemplos de características controladas por um único gene maior incluem resistência monogénica a doenças e altura das plantas. Num programa de melhoramento, é relativamente simples selecionar este tipo de características, quando são de interesse económico, uma vez que a sua segregação é, também, relativamente simples. No entanto, se houver vários genes que condicionem a expressão de determinada característica – epistasia, a complexidade na identificação das diferentes classes, ou fenótipos, aumenta (Simmonds & Arthur, 2003).

As características quantitativas, pelo contrário, são controladas pela ação conjunta de vários genes menores e denominam-se, por isso, poligénicas. Pensa-se que a contribuição de cada gene menor para a expressão de determinada característica seja aditiva e estes dão origem a elevada variabilidade, caracterizada por ser contínua. A distribuição da expressão deste tipo de características caracteriza-se por se aproximar da distribuição normal e pode ser descrita pela sua média e variância, sendo esta última variável um indicador da sua variabilidade (Brown et al., 2014; Simmonds & Arthur, 2003). As características de interesse económico são geralmente quantitativas e constituem o objeto de seleção em todos os

programas de melhoramento, apresentando a desvantagem de serem muito mais difíceis de selecionar. A sua complexidade deve-se também ao facto de a sua expressão ser altamente influenciada pelas condições ambientais, apresentando diferentes performances quando expostas a diferentes condições (Simmonds & Arthur, 2003). Uma das maiores dificuldades num programa de melhoramento, quando os objetivos de seleção assentam em características quantitativas, é identificar os génotipos de maior interesse com base na sua expressão fenotípica, o que faz com que seja de extrema importância implementar um delineamento experimental adequado (Brown et al., 2014). Características quantitativas incluem o rendimento, uma das mais importantes, qualidade nutritiva do fruto/semente, resistência não-monogénica a doenças, adaptabilidade e desenvolvimento (Caligari & Brown, 2003; Daubeny, 1987; Fejer, 1977; Jennings, 1983; Misic, 1970; Vrain et al., 1994).

### **2.2.2. Objetivos**

No melhoramento de framboesa, há objetivos chave que são transversais a todos os programas de melhoramento, de forma a obter génotipos superiores que correspondam às exigências de qualidade, sustentabilidade e adaptabilidade, nomeadamente: qualidade do fruto, em termos de tamanho, brilho, firmeza, cor e sabor; rendimento; resistência e/ou tolerância a pragas e doenças; resistência e/ou tolerância a fatores abióticos; facilidade de colheita. Neste trabalho foram focados 3 objetivos de melhoramento principais, que foram o alvo de estudo e avaliação: resistência à ferrugem tardia (*Thekopsora americana*), precocidade na produção e cor do fruto.

#### **2.2.2.1. Resistência a pragas e doenças: ferrugem tardia**

Com a diminuição da quantidade de produtos fitofarmacêuticos disponíveis no mercado e com o aumento da pressão para uma produção mais sustentável, tem-se verificado uma ênfase crescente no modo de Produção Integrada. Atualmente, não há cultivares que apresentem simultaneamente frutos de elevada qualidade e resistência ou tolerância a pragas e doenças, mas a sua obtenção é essencial para a produção de culturas resilientes em contexto de Produção Integrada (Jennings, 2018).

A obtenção de cultivares com esta característica tem sido um dos objetivos do melhoramento europeu e várias fontes de resistência de diferentes espécies de *Rubus* spp., para vários agentes patogénicos, têm sido identificadas e exploradas no melhoramento convencional (Birch et al., 2002; Jennings, 1988; Jones et al., 2002; Jones & McGavin, 1998; Keep et al., 1977; Knight, 1991; Williamson & Jennings, 1992). Recentemente, o foco tem-se direcionado para a seleção de caracteres físicos da planta que lhe proporcionem tolerância, fruto dos mecanismos de defesa contra herbívoros, que podem ser explorados com esse objetivo (Graham et al., 2014; Karley et al., 2016). Tomando como exemplo os fungos, uma das estratégias passa por selecionar génotipos com características morfológicas

desfavoráveis ao desenvolvimento das doenças das quais são agentes causais, tais como boa separação e exposição dos frutos, facilidade de colheita, firmeza e menor densidade de folhagem que contribuem para o bom estado fitossanitário dos lançamentos (Oliveira et al., 2007).

Em Portugal, as doenças que podem provocar maiores prejuízos na cultura da framboesa são a ferrugem, que pode ser causada por dois fungos distintos: *Phragmidium rubi-idaei* (DC.) P. Karst (ferrugem amarela) ou *Thekopsora americana* (Farl.) Aime & McTaggart (Aime & McTaggart, 2021) (anteriormente denominado *Pucciniastrum americanum* (Farl.) Arthur, que provoca a ferrugem americana ou tardia), e a podridão cinzenta, causada pelo fungo *Botrytis cinerea*. As pragas chave são os ácaros – *Tetranychus* sp. (vermelho) e *Eotetranychus carpini borealis* (Ewing, amarelo) -, e a drosófila-da-asa-manchada – *Drosophila suzukii* Matsumura (Oliveira, 2021).

Na cultura da framboesa, em conjunto com a podridão cinzenta, a ferrugem é considerada uma doença chave em Portugal, em particular a ferrugem tardia, devido aos elevados prejuízos que pode originar, por apresentar maior expressão e por ser de mais difícil controlo (Oliveira, 2021).

A ferrugem tardia ataca as formas cultivadas de framboesa vermelha, preta e algumas formas selvagens. Em ataques severos provoca desfoliação prematura o que, consequentemente, reduz o vigor da planta e aumenta a suscetibilidade dos lançamentos a danos pelo frio no inverno. Afeta também os frutos, impedindo que sejam comercializados em fresco devido à presença de massas de esporos nas drupéolas (Ellis et al., 1991). Em cultivares remontantes tardias e em cultivares suscetíveis, como a 'Heritage' e a 'Festival', os frutos imaturos são afetados, podendo verificar-se uma quebra de 30 a 100% dos frutos comercializáveis (Funt, 2013).

### *Epidemiologia*

O fungo *T. americana* pertence à classe dos *Pucciniomycetes*, à ordem *Pucciniales* e à família *Coleosporiaceae* (Aime & McTaggart, 2021).

É um fungo não sistémico, heteroico<sup>2</sup> e macrocíclico<sup>3</sup>, desenvolvendo uredínios e télios no hospedeiro principal, a framboesa vermelha, e espermagónios e aécios no hospedeiro alternativo, o pinheiro-do-Canadá (*Picea glauca*). No final da primavera, são libertados aeciósoros do pinheiro-do-Canadá, que provocam infeções primárias no hospedeiro principal, a framboesa, das quais se desenvolvem pústulas urediniais. Destas pústulas libertam-se urediniósoros (Figura 4) que provocam sucessivas infeções secundárias na planta. Através destas infeções, a ferrugem consegue desenvolver-se apenas no hospedeiro

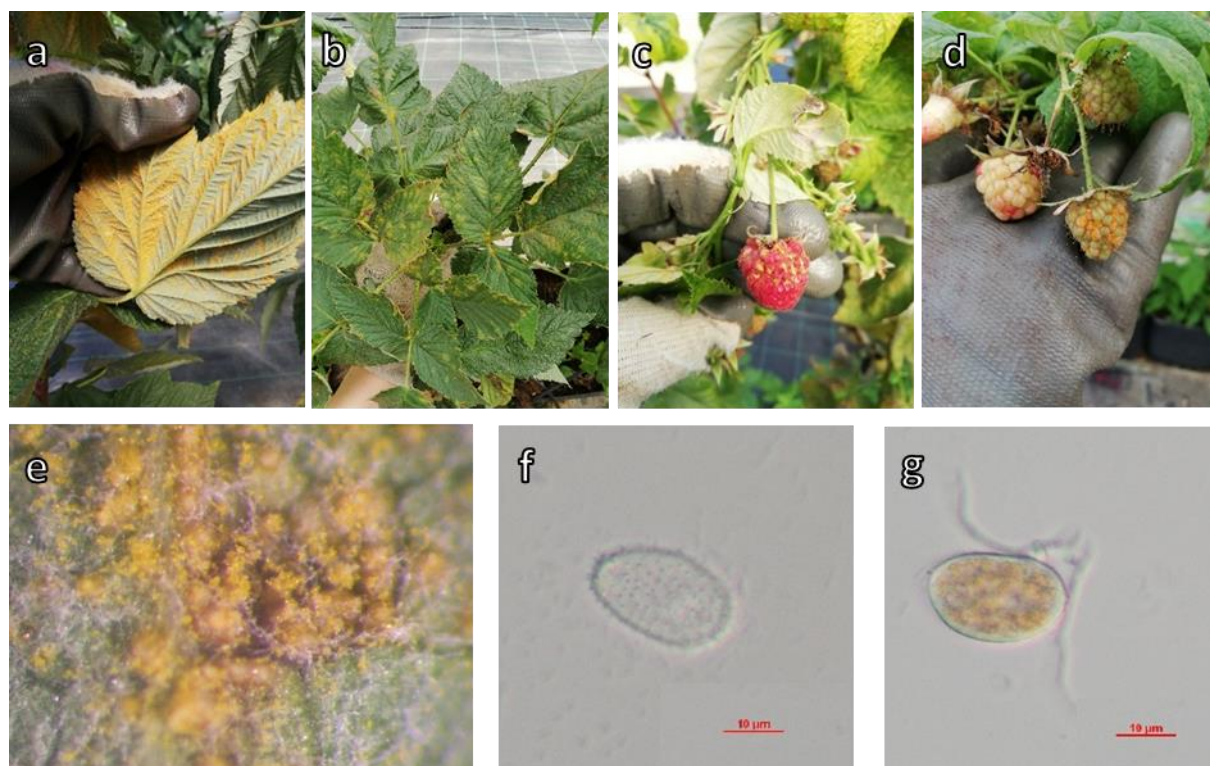
---

<sup>2</sup> Fungos caracterizados como heteroicos necessitam de dois hospedeiros distintos para concluírem o seu ciclo de vida completo (Luffman & Buszard, 1989).

<sup>3</sup> Fungos que produzem cinco tipos de esporos diferentes são denominados macrocíclicos (Walker, 1969).

principal, não necessitando de cumprir a fase de desenvolvimento no hospedeiro secundário (Ellis et al., 1991).

As condições ótimas para o seu desenvolvimento ocorrem a temperaturas entre os 18 e os 26 °C e elevada HR. Num ensaio de germinação de urediniósporos de ferrugem tardia, onde foram combinados diferentes valores de temperatura e de duração de humedecimento da folha, Ribeiro (2021) observou que o intervalo de temperaturas ótimas para a germinação dos esporos se situa entre os 15 e os 20 °C, sendo esta máxima aos 20 °C. A autora concluiu também que a duração mínima de período de humectação das folhas para que se observe germinação de esporos é de 4 horas e que esta é máxima após 12 horas.



**Figura 4** – Página inferior de folha de framboeseira coberta com lesões esporulantes de *T. americana* (a); manchas cloróticas na página superior de folhas de framboeseira, provocadas pela infecção por *T. americana* (b); framboesa madura com lesões esporulantes de *T. americana* (c); framboesas imaturas com lesões esporulantes de *T. americana* (d); aglomerado de esporos de *T. americana* na página inferior de uma folha de framboeseira (e); urediniósporos de *T. americana* vistos ao microscópio (f,g). As quatro fotos da série de cima foram registadas no PIF, em agosto de 2022.

Os urediniósporos são disseminados pelo vento e de forma mecânica, de órgãos infetados para órgãos saudáveis. Os esporos germinam e os tubos germinativos penetram na folha pelos estomas, localizados na página inferior. Estas são mais suscetíveis à infecção quando adultas e fisiologicamente ativas, por oposição a folhas mais jovens ou mais velhas. Formam-se pequenos uredínios na página inferior das folhas infetadas, que libertam esporos amarelo-alaranjados (Ellis et al., 1991). Estes podem infetar flores, cálices, pecíolos, frutos e também lançamentos. Na página superior desenvolvem-se pequenas manchas cloróticas que evoluem para uma coloração castanha antes que as folhas caiam (Figura 4). O fungo consegue resistir durante o inverno sob a forma de micélio uredinial nos lançamentos da

planta, produzindo novos uredínios para reinfeção na primavera, e voltando a diminuir a atividade quando as temperaturas aumentam nos meses de verão (Luffman & Buszard, 1989).

### *Tipos de Resistência*

A resistência a pragas e doenças, em plantas, pode ser determinada de forma qualitativa (sendo adquirida através de um único gene) ou quantitativa (sendo adquirida através de múltiplos genes) (Brown et al., 2014).

Resistência vertical ou específica é o nome dado àquela que tem origem num único gene e que resulta, geralmente, numa expressão fenotípica binária bastante distinta, entre resistente e suscetível. Esta traduz a capacidade que genes individuais têm de conferir resistência a determinadas raças de uma doença ou praga. Os alelos individuais destes genes são de fácil identificação e transferência entre genótipos, sendo geralmente originários de formas selvagens e introduzidos em variedades comerciais através de retrocruzamentos (Brown et al., 2014). A segregação de genes individuais pode ser estimada com elevada fiabilidade e a seleção de genótipos resistentes pode ser realizada através de testes de infeção com raças específicas de patogénios (Brown et al., 2014). No entanto, este tipo de resistência apresenta a desvantagem de ser rapidamente ultrapassada com o aparecimento de novas raças do patogénio (Brown et al., 2014).

Resistência horizontal, não-específica, geral ou parcial, por outro lado, é aquela conferida pela combinação de alelos de diversos genes, o que, conseqüentemente, faz com que este tipo de resistência apresente maior longevidade, para além de ser eficaz contra um leque variado de raças do mesmo patogénio. Produz um fenótipo suscetível que manifesta vários níveis de severidade da doença e evolução da mesma a uma velocidade reduzida (Bariana, 2003). Esta resistência apresenta, no entanto, a dificuldade de ser transferida dos progenitores para a descendência (Brown et al., 2014).

No respeitante à resistência à ferrugem noutras culturas que não a framboesa vermelha, é possível encontrar bibliografia mais extensa que reporta os mecanismos genéticos que a regulam. Na cultura do trigo (duro e mole), mais de 187 genes de resistência aos três tipos de ferrugem principais (*Puccinia triticina* Eriks, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* West e *Puccinia striiformis* Westend.) foram identificados e mapeados (Aktar-Uz-Zaman et al., 2017). A resistência em plantas jovens é monogénica, específica, de controlo vertical por genes principais e de reação hipersensível (ver secção seguinte). Pelo contrário, a resistência em plantas adultas caracteriza-se por ser poligénica, geral, de controlo horizontal por genes secundários e, conseqüentemente, de maior durabilidade. No entanto, a maioria dos genes de resistência à ferrugem, particularmente a que ataca as folhas, que são cerca de 80, confere o tipo de resistência descrito para as plantas jovens (Flor, 1942; McIntosh et al., 2008; Samsampour et al., 2010). Na cultura da soja, foram identificados quatro genes principais de resistência à ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd.), bem como manifestações de

resistência parcial (Hartman et al., 2005). O mesmo acontece nas cultivares de *Coffea arabica* L., nas quais foram identificados mais de nove genes principais de resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. & Broome) e manifestações de resistência parcial ou incompleta (Sera et al., 2010).

No caso particular da ferrugem tardia, Jamieson e Nickerson (1999) postulam a existência de um único gene dominante, que denominam *Pa*, que controla a resistência à ferrugem tardia em plantas de framboesa vermelha. A sua hipótese é testada através da avaliação da descendência resultante de cruzamentos controlados entre linhas parentais, que consideram ser heterozigóticas, previamente classificadas pelos autores como resistentes (ausência de pústulas), intermédios (desenvolvimento de poucas pústulas) e suscetíveis (desenvolvimento de muitas pústulas). A frequência observada para o rácio resistentes:suscetíveis é comparada com os valores esperados para o mesmo rácio num modelo de gene único, através de testes qui-quadrado. A maioria dos cruzamentos originou descendência cujo rácio mencionado corroborou a hipótese postulada pelos autores. Naqueles em que tal não se verificou, nomeadamente aqueles em que um dos progenitores era a cultivar 'Boyne', foram apresentadas 3 justificações possíveis: 1) esta cultivar possui um fator hereditário que restringe a expressão da resistência; 2) a resistência é controlada por mais do que um gene, sendo uma característica que se expressa de forma quantitativa na descendência; 3) o gene de resistência está interligado a outros genes que reduzem a eficácia da resistência, fenómeno reportado anteriormente por outros autores (Daubeny & Stary, 1982; Keep, 1968).

Relativamente à ferrugem tardia, não existe bibliografia que reporte os mecanismos genéticos específicos que regulam a resistência em framboesa vermelha. No caso da ferrugem amarela, causada pelo fungo *Phragmidium rubi-idaei*, Anthony et al. (1986) propõem que a resistência possa ser regulada por diversos mecanismos, decorrente da avaliação de um cruzamento dialelo entre progenitores que apresentam diferentes níveis de resistência (cvs. Boyne, Meeker, Malling Jewel, Glen Prosen e Glen Clova): 1) resistência vertical ou completa, conferida por um único gene, *Yr*; 2) resistência horizontal ou incompleta, controlada por um complexo poligénico; 3) resistência conferida por genes que regulam características morfológicas da planta, como a pubescência dos lançamentos, controlada pelo gene *H*, que se verificou exercer influência não desprezável no nível de resistência incompleta expressa pelas plantas. Os autores reportam que os génotipos com lançamentos pubescentes, ou seja, portadores do gene *H*, apresentam menor nível de resistência do que aquelas com lançamentos glabros (*hh*). Graham et al. (2006) foram bem-sucedidos no mapeamento das regiões do ADN às quais se associam a resistência a 4 doenças, nomeadamente à ferrugem amarela, na população resultante do cruzamento entre as cvs. Glen Moy – que possui lançamentos pubescentes e resistência à dessecação dos caules (*Dydimella appianata* (Niessl) Sacc.) e podridão dos caules (*Botrytis cinerea* Pers.) – e Latham – que possui lançamentos glabros e resistência à antracnose (*Elsinoë veneta* (Burkh.) Jenkins) e ferrugem

amarela (*Phragmidium rubi-idaei* (DC.) P. Karst.). No entanto, os autores não encontraram uma relação significativa entre o gene *H*, que determina a pubescência dos lançamentos, e a resistência à ferrugem amarela, como anteriormente proposto por outros autores (Jennings, 1982; D. Jennings & McGregor, 1988; Williamson & Jennings, 1986). É consensual entre vários autores que a severidade<sup>4</sup> da ferrugem é um bom indicador para aferir a resistência de diferentes genótipos (Luffman & Buszard, 1989; Ribeiro, 2021). De facto, o sistema de classificação da resistência à ferrugem (e outras doenças) de várias cultivares constantes das listas de recomendação elaboradas por entidades governamentais de diversos países, tem por base a severidade das doenças (<https://extensionaus.com.au/>).

### *Mecanismos de resistência*

Segundo Brown et al. (2014) e Nelson (1978), a resistência a doenças, em plantas, pode manifestar-se através de dois mecanismos principais.

O primeiro, denominado hipersensibilidade, corresponde à capacidade da planta de inibir ou restringir quase completamente a infeção pelo patógeno. O mecanismo de hipersensibilidade é aquele que se manifesta mais frequentemente na resistência a doenças, sendo controlado por genes individuais, o que, geralmente, resulta numa fácil incorporação de resistência em programas de melhoramento. A planta hospedeira possui um ou poucos genes de resistência correspondentes a um patógeno específico, que, por sua vez, possui genes correspondentes de avirulência. Quando o patógeno tenta infetar a planta hospedeira, os genes de avirulência ativam os genes de resistência na planta, resultando numa cadeia de reações que neutralizam e eliminam o patógeno. Ocorre uma reação rápida e localizada no tecido da planta, que reage imediatamente através da necrose das células que rodeiam a zona afetada, interrompendo o contacto com o restante tecido vivo e impedindo a progressão do patógeno (Agrios, 2005).

Através do segundo mecanismo, a planta restringe o desenvolvimento e multiplicação do fungo após a ocorrência de uma infeção inicial. Este é também denominado como 'resistência parcial' por Nelson (1978). Este tipo de mecanismo manifesta-se através da expressão de genes que regulam a formação de estruturas ou substâncias tóxicas que retardam ou inibem o desenvolvimento da doença. Estas podem ser pré-existentes na planta ou ser produzidas em resposta ao ataque pelo patógeno. Exemplo de estruturas pré-existentes são a espessura e o tipo de cera e cutícula que cobrem as células da epiderme, a sua estrutura, o tamanho, localização e formato dos estomas e lenticelas e a presença de tecidos compostos por células de paredes celulares espessas que prejudicam o avanço do patógeno na planta. As substâncias formadas como reação ao ataque são desencadeadas por ativação dos genes que regulam a sua expressão, havendo a acumulação de substâncias químicas nos tecidos

---

<sup>4</sup> Proporção de área foliar afetada em relação à área foliar saudável (Agrios, 2005).

da planta, numa concentração elevada, que são tóxicas (enzimas, toxinas, entre outras) para o patogénio e afetam o seu desenvolvimento (Agrios, 2005). Luffman & Buszard (1989) classificaram as cvs. Nova e Boyne como exibindo resistência parcial à ferrugem tardia, por terem apresentado um período de latência<sup>5</sup> mais longo, assim como menor densidade e dimensão de uredínios, o que resultou numa diminuição da capacidade de progressão da doença. Este mecanismo é de regulação poligénica, uma vez que vários genes estão envolvidos na formação e produção das diferentes estruturas e substâncias (Agrios, 2005).

#### 2.2.2.2. Precocidade

O primeiro grande programa de melhoramento de variedades remontantes de framboesa com vista à antecipação da sua época de produção – na altura, para o início de agosto, remonta a 1934, na estação Experimental Agrícola do Estado de Nova Iorque. Na Europa, os mesmos esforços de melhoramento com vista ao desenvolvimento de variedades remontantes mais precoces iniciam-se duas décadas mais tarde, na década de 50. Ambos os programas se depararam com as mesmas limitações iniciais: o carácter de precocidade não era transmitido eficazmente pelos progenitores utilizados como dadores; os descendentes precoces não o eram suficientemente para completar a época de produção; alguns cruzamentos originaram descendência com muito baixo vigor; a baixa percentagem de descendentes que apresentava produção relativamente precoce, apesar de desenvolver uma quantidade aceitável de laterais frutíferos, desenvolvia, também, frutos pequenos e de má qualidade (pouca firmeza, cor pálida), bem como baixo rendimento (Keep, 1988). Relativamente ao insucesso da transferência do carácter de frutos de elevado calibre em cruzamentos com clones não-remontantes, Ourecky (1978) postula a hipótese de que a característica de pequeno calibre dos frutos pudesse estar geneticamente relacionada com a característica remontante. Em 1976, o autor reportara já uma relação entre a capacidade de formação de laterais frutíferos, característica intimamente relacionada com o rendimento da planta e que afirma aparentar ser aditiva, e frutos de pequeno calibre. A seleção para frutos de maior calibre estava associada a menor número de laterais frutíferos e maturação mais tardia (Ourecky, 1976). Lawrence (1976), por sua vez, reportou uma relação significativa entre floração precoce e elevado número de laterais frutíferos nas descendências resultantes do cruzamento entre variedades remontantes. O autor atribui a capacidade de formar laterais frutíferos à interação entre alelos dominantes e recessivos de dois genes complementares.

Na sequência destes fracos resultados iniciais, foram realizados cruzamentos com a introdução de novo material genético, nomeadamente seleções da variedade selvagem *Rubus idaeus strigosus*, que provou ser um bom dador de precocidade. Algumas décadas mais tarde, os cruzamentos derivados deste progenitor foram bem-sucedidos na produção de indivíduos

---

<sup>5</sup> Período de tempo compreendido entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas (Luffman & Buszard, 1989).

mais precoces: a maturação dos seus frutos iniciava-se antes de 15 de agosto, e estes apresentavam maior dimensão e melhor qualidade. Os cruzamentos subsequentes geraram descendências com 20 a 47% de indivíduos a atingirem a maturação durante agosto, sendo que a descendência mais precoce apresentava 6% dos indivíduos com maturação dos frutos durante a primeira semana de agosto (Keep, 1988).

Paralelamente, no centro de investigação de *East Malling*, eram atingidos avanços significativos na introdução de precocidade e rendimento em descendentes derivados de *R. idaeus* e *R. strigosus*, através da introgressão do carácter de precocidade em variedades remontantes, proveniente de *R. arcticus*, *R. odoratus* e *R. spectabilis* (Keep, 1988; Knight, 1991).

De facto, a espécie *Rubus spectabilis* revelou-se um ótimo dador de precocidade bem como de algumas qualidades desejáveis do fruto, originando descendências com elevado potencial cultural e frutos de cor atrativa (Keep, 1988). Em 1983, o programa lançou a cultivar remontante que é, até hoje, a mais precoce produzida comercialmente: a cv. Autumn Bliss, que apresenta elevado rendimento e deriva das espécies *Rubus arcticus* e *Rubus occidentalis* (Keep, 1988). Esta cultivar impulsionou o desenvolvimento de cultivares remontantes a nível mundial, tendo sido utilizada como progenitor em vários programas de melhoramento e foi, durante vários anos, a cultivar remontante *standard* produzida comercialmente na Europa central e do norte (Finn et al., 2008; Jennings, 2018; Keep, 1988). Perdeu popularidade, no entanto, devido à produção de frutos com baixa firmeza, propriedades organolépticas desinteressantes, baixo poder de conservação e frutos de calibre pouco satisfatório (Sønsteby & Heide, 2010). A qualidade dos frutos de variedades remontantes foi sendo progressivamente melhorada através da introgressão de qualidade através de variedades não-remontantes, principalmente devido ao trabalho desenvolvido por Jennings (2002) através do antigo *Scottish Crop Research Institute* (SCRI) e da *Medway Fruits*, em Inglaterra.

Sønsteby & Heide (2010) estudaram os efeitos do genótipo e temperatura na precocidade, rendimento e qualidade do fruto de seis cultivares remontantes de framboesa, no sul da Noruega, aplicando 3 tratamentos de temperaturas (20, 22 e 26 °C), no período de pré floração. Entre as cultivares incluíam-se a 'Autumn Bliss' e a 'Polka', sendo a segunda descendente da primeira (Danek, 2002). Os autores verificaram que, apesar de a cv. Autumn Bliss manter a posição de cultivar remontante mais precoce, apresentando a primeira data de colheita no início de agosto e sendo a primeira a atingir 50% da colheita efetuada, a cv. Polka é mais promissora como remontante precoce. Esta apresentou a primeira data de colheita apenas uma semana mais tarde que a 'Autumn Bliss', para além de elevado rendimento, frutos de elevado calibre, boa firmeza e sabor.

Os autores identificam também uma correlação positiva significativa entre precocidade (data de 50% de colheita) e rendimento, tendo observado que as cultivares mais precoces – 'Autumn Bliss' e 'Polka' - foram também aquelas que apresentaram maior rendimento (640

g/planta comparativamente a uma média de 286 g/planta das outras 4 cvs.). A percentagem de nós onde se verificou floração e frutificação foi bastante elevada e o número de gomos em dormência foi baixo em ambas as cvs. mais precoces. Os autores concluem que este último indicador é a característica arquitetural das plantas que maior influência exerce (explica 47% da variabilidade) no rendimento. A cv. Polka produziu frutos com elevado peso, enquanto a cv. Autumn Bliss não correspondeu com o aceitável nos parâmetros de qualidade do fruto, mas compensou com o número de frutos produzidos, que foi o mais alto, devido a uma maior percentagem de floração por lateral produtivo. Através de uma análise de variância, Sønsteby & Heide (2010) verificam que a interação entre os fatores cultivar e temperatura tem um efeito significativo tanto na precocidade como no rendimento.

Estes resultados vão ao encontro das conclusões de Keep (1961), que afirma que a época de frutificação das variedades de framboesa remontantes é regulada por mecanismos genéticos complexos, sendo uma característica de expressão altamente variável e influenciável pelo ambiente; e de Carew et al. (2003) e Sønsteby et al. (2009), que apontam para florações e maturação dos frutos mais precoces quando se verifica um aumento acentuado da temperatura – na faixa dos 20 a 25 °C - durante o período de pré-floração de cultivares remontantes.

As mais recentes cvs. remontantes, como a ‘Polka’ e algumas lançadas por programas de melhoramento mais recentes, conjugam precocidade com elevado rendimento e qualidade do fruto (Danek, 2002; Gambardella et al., 2016; Mladin & Mladin, 2008), atestando o sucesso em ultrapassar as limitações dos esforços das primeiras tentativas de melhoramento com estes objetivos, como descrito acima.

Atualmente, a época de produção das cultivares remontantes inicia-se com a abertura das primeiras flores no final de junho (‘Autumn Bliss’) até meados de julho, que culminam no início da maturação dos frutos entre o final de julho, para as cultivares mais precoces, e meados de agosto, para as cultivares mais tardias (Funt, 2013).

No que diz respeito aos mecanismos genéticos que condicionam a época de maturação dos frutos em framboesa vermelha, Graham et al. (2009) estudaram a descendência e os progenitores do cruzamento entre uma cultivar de framboesa vermelha europeia, ‘Glen Moy’, e uma cultivar de framboesa vermelha norte americana, ‘Latham’. O principal objetivo do estudo prendia-se com o mapeamento de secções específicas do genoma (*Quantitative Trait Loci* – QTLs) relacionadas com o processo de maturação do fruto, na expectativa de identificar possíveis genes de regulação do processo de frutificação, desde o abrolhamento dos gomos até à maturação dos frutos. Para tal, os autores relacionaram a presença ou ausência de determinados marcadores moleculares com o número de dias necessário para atingir cada estado de desenvolvimento. Foram identificados QTLs relacionados com a maturação dos frutos em quatro cromossomas, bem como marcadores moleculares com uma relação significativa com diversos estados de desenvolvimento, em cada um deles. Uma descoberta

particularmente interessante foi, mais uma vez, a relação do gene *H* – que regula a pubescência dos lançamentos da planta (Jennings, 1982) – com o estado de maturação: o genótipo heterozigótico *Hh* (canas pubescentes) estava associado a um atraso relativamente a todos os estados compreendidos entre a abertura dos botões florais até à completa coloração do fruto. Os tricomas e os espinhos são estruturas que se desenvolvem a partir das células da epiderme, o que poderá indicar que o gene *H* atua relativamente cedo no desenvolvimento da planta, afetando várias características das células e possivelmente atrasando o desenvolvimento da planta, que culmina na maturação dos frutos, hipótese postulada pelos autores para explicar o fenómeno acima descrito.

### 2.2.2.3. Qualidade do fruto: cor

A qualidade do fruto é, juntamente com o rendimento, um objetivo de elevada prioridade nos programas de melhoramento, desde os primórdios do melhoramento em framboesa (Darrow, 1937; Graham & Brennan, 2018; Hedrick, 1925). Esta subdivide-se em características como o calibre, a cor, o brilho, a firmeza, o sabor, a composição química e a perecibilidade (Graham & Brennan, 2018; Oliveira et al., 2007). Para o mercado em fresco, a cor, o brilho, o tamanho e a forma são fatores determinantes para a aceitação inicial do consumidor.

Na cultura da framboesa, os frutos podem assumir tonalidades que vão desde o preto, roxo, uma vasta gama de vermelhos, cor de laranja (mais ou menos claro), amarelo a muito perto do branco (Hall et al., 2009). A tonalidade mais atrativa para o consumidor, nas framboesas que se destinam ao consumo em fresco, varia bastante entre os mercados dos diferentes países, mas situa-se principalmente entre vermelho-claro e cor de laranja (Hall et al., 2009). As cultivares desenvolvidas pela *Driscoll's SA* produzem frutos tradicionalmente vermelho-alaranjados, tendencialmente preferidos pelos consumidores californianos, enquanto na Europa as tendências de consumo apontam para frutos vermelhos de tonalidade mais escura (Hall et al., 2009; Oliveira et al., 2007). A cor dos frutos deve transmitir frescura, que está associada a tonalidades entre um vermelho-claro a intermédio, pelo que durante o processo de seleção são eliminadas linhas com frutos de tonalidade escura ou que, mesmo sendo mais clara, escureça rapidamente durante o processo de maturação, na planta e em pós-colheita (Hall et al., 2009). Estas características são associadas a frutos demasiado maduros e de má qualidade (Hall et al., 2009).

A regulação bioquímica desta característica é complexa, sendo o resultado da combinação entre o tipo e concentração de antocianinas presente – maioritariamente cianidinas e pelargonidinas -, e o ambiente celular em que se encontram (Hall et al., 2009; Jennings, 1988; Wang et al., 2009). A expressão final da cor do fruto é também influenciada pela ação de co-pigmentos e pelo pH. Para além do tipo de antocianinas presentes, a cor do

fruto é determinada pelo pH vacuolar das células do fruto, cuja variação induz transformações estruturais dos pigmentos, afetando tanto a tonalidade como a intensidade da cor. Assim, frutos com o mesmo perfil de antocianinas podem apresentar cores diferentes, que podem também variar com a maturação e alteração do pH do fruto (Stintzing et al., 2002; Yoshida et al., 2003). A co-pigmentação potencia a formação de interações complexas entre pigmentos e compostos incolores, como flavonoides, alcaloides, aminoácidos, polissacarídeos, metais, ácidos orgânicos e outras antocianinas, que atuam no aumento da intensidade da cor (Castañeda-Ovando et al., 2009).

Para além da regulação bioquímica, foram também identificados e descritos vários genes que se acredita que condicionem a expressão de diferentes cores do fruto de framboesa (Hall et al., 2009).

Crane & Lawrence (1931) identificam um conjunto de dois genes maiores, *P* e *T*, que exercem ação conjunta na pigmentação do fruto e em vários órgãos vegetativos da planta de framboesa. Os autores postulam que o gene *T* influencie a capacidade de síntese de antocianinas em várias partes da planta, tanto na espécie de framboesa vermelha europeia (*Rubus idaeus* L.) como na de framboesa preta (*Rubus occidentalis* L.). O seu alelo recessivo *t* dá origem a fenótipos que expressam frutos amarelos e órgãos vegetativos (caules, folhas e espinhos) não-pigmentados ou, na presença do gene *P*, espinhos tingidos e frutos amarelo-alaranjados. Na presença do alelo dominante *T*, o gene *P* intensifica a cor dos espinhos, passando de tingidos a vermelhos. São identificados três fenótipos para a cor do fruto em framboesa vermelha europeia (*Rubus idaeus* L.): frutos vermelhos, expressos pelos genótipos *P-T*-; frutos amarelo-alaranjados, expressos pelos genótipos *P-tt*, devido a uma baixa concentração de antocianina; e frutos amarelos, expressos pelo genótipo *pptt*. Os autores sugerem também uma relação de epistasia entre o gene *T* e um outro gene, *Bl*, com dominância incompleta, para explicar a formação de pigmentos que conferem coloração preta nos frutos, por oposição a frutos de coloração roxa e vermelha.

No entanto, em 1984, Keep propõe uma outra explicação para a expressão de coloração amarelo-alaranjada nos frutos: um gene *i* interage apenas com o gene *T*, que regula a cor dos frutos, reduzindo a concentração de antocianinas no fruto. Plantas com o genótipo *TTii* possuem frutos amarelo-alaranjado, em vez de vermelhos, conjuntamente com os restantes órgãos vegetativos apresentando vários níveis de pigmentação. A autora baseia esta hipótese no facto de os descendentes do cruzamento entre um genótipo russo, que exibia frutos amarelo-alaranjados e espinhos roxo-escuro, bem como caules e folhas pigmentados, com dois genótipos de frutos amarelos e espinhos sem pigmentação, não terem segregado para frutos amarelo-alaranjados e segregarem para espinhos pigmentados. A autora afirma que tal se deve ao facto de um deles ser heterozigótico e o outro homozigótico para o gene *P*, o que contraria a hipótese proposta por Crane & Lawrence (1931) de que genótipos *Ptt* exibem frutos amarelo-alaranjados, e de que este gene exerce um efeito pleiotrópico em genótipos *tt*.

Foi também postulado por Jennings & Carmichael (1975) a existência de mais dois genes que interferem na expressão da cor dos frutos de framboesa. O gene *Y*, derivado de *Rubus phoeniculasius*, epistático sobre o gene *T* e dominante sobre os seus alelos, inibindo a sua regulação para a síntese de antocianinas no fruto, que passam a exibir coloração amarela. Os genes que condicionam a ação do gene *T* não têm influência no gene *Y*. Da espécie *R. phoeniculasius* deriva também um gene *Ys*, que inibe a ação do gene *Y*, permitindo a síntese de antocianinas que conferem a cor vermelha aos frutos.

Para além da influência dos genes referidos na cor dos frutos, o tipo de pigmentos dentro do grupo das antocianinas, nomeadamente o tipo de açúcares a que estes estão ligados, tem também influência na variação de tonalidade e intensidade de determinada cor do fruto. Jennings & Carmichael (1980) descreveram os genes *R*, *So* e *Xy*, que condicionam a síntese dos açúcares ramnose, sofrorose e xilose, respetivamente, cuja presença condiciona o tipo de pigmentos de antocianinas presentes no fruto e, conseqüentemente, a sua tonalidade. Frutos com maior concentração de pelargonidina, por exemplo, apresentam uma tonalidade de vermelho mais alaranjada (Jennings & Carmichael, 1980).

McCallum et al. (2010) estudaram o efeito genético e ambiental na expressão da cor do fruto na população descendente do cruzamento entre uma variedade europeia e outra norte-americana de framboesa vermelha, ao longo de 3 anos. Os autores verificaram que a cor variou significativamente entre descendentes e entre anos, mas não apresentou variação significativa entre os 3 locais onde foi instalada. Para além disso, os autores também observaram que as heritabilidades para a maioria dos parâmetros de cor medidos foram consideravelmente elevadas (65,4 – 88,8%).

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Local de realização do ensaio

As diferentes fases dos ensaios foram realizadas em dois locais: nas instalações do INIAV, I.P., localizadas na Quinta do Marquês, em Oeiras, Lisboa, e no polo de inovação da Fataca - Herdade Experimental da Fataca, Odemira.

##### *Polo de Inovação da Fataca*

O Polo de Inovação da Fataca (PIF) é constituído pela Herdade Experimental da Fataca, que integra a cadeia de valor da fruticultura e está especializado na produção intensiva de pequenos frutos, com especial ênfase para as culturas protegidas em hidroponia, nomeadamente amoras, morangos, mirtilos e framboesas. A herdade está localizada a uma latitude de 37°35'25.1"N e longitude de 8°44'25.1"O, no concelho de Odemira, distrito de Beja, no baixo Alentejo litoral (Figura 5). Esta região de Portugal apresenta um clima do tipo Csb, de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger, que é caracterizado por um clima temperado com verão seco e suave.



**Figura 5** – Localização geográfica do concelho de Odemira em Portugal Continental.

## 3.2. Material Vegetal

### 3.2.1. Genótipos

As famílias de plantas de framboesa avaliadas no âmbito desta dissertação têm origem em três cruzamentos, todos realizados com o mesmo progenitor feminino, mas com progenitores masculinos diferentes.

#### *Progenitor Feminino*

O genótipo utilizado como PF foi selecionado no âmbito do programa de melhoramento de framboesa a decorrer no PIF, implementado pelo INIAV, I.P., em parceria com a empresa BeiraBaga, e tem origem numa família de polinização aberta de uma cultivar comercial.

O PF é uma variedade remontante de *R. idaeus* L. e apresenta características do fruto bastante apelativas e economicamente interessantes (calibre, aroma, sabor, rendimento). Apresenta também, no entanto, três características indesejáveis: 1) elevada suscetibilidade à doença da ferrugem tardia, causada pelo fungo *T. americana*; 2) produção tardia (demora em média 129 dias, ou 19 semanas, desde a plantação até à altura de colheita); 3) cor do fruto demasiado escura. Na Figura 6 é possível ver a planta e os frutos do PF, instalado no PIF.

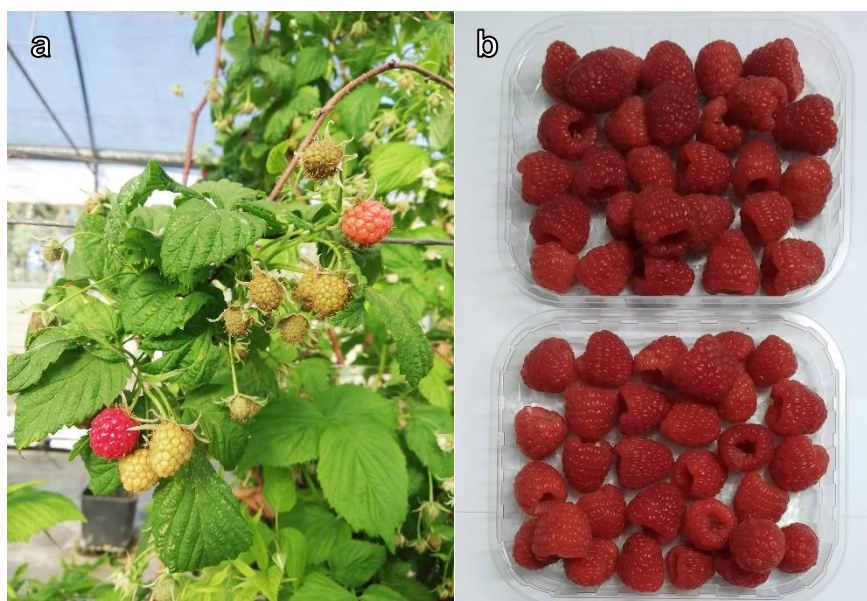


Figura 6 – Planta (a) e frutos (b) do PF, instalado no PIF.

#### *Família 1*

A família 1 (Fam1) resulta do cruzamento entre o PF e o progenitor masculino 1 (PM1). Este genótipo é parte integrante da coleção de variedades de framboesa mantida no PIF e caracteriza-se por pertencer à espécie *R. idaeus* L., ser remontante e apresentar uma elevada resistência à ferrugem, para as condições de campo do local. Assim, o cruzamento que

originou esta família teve como principal objetivo tentar introduzir resistência à doença da ferrugem tardia no genótipo do PF. Na Figura 7 é possível observar um exemplar do PM1, instalado no PIF.



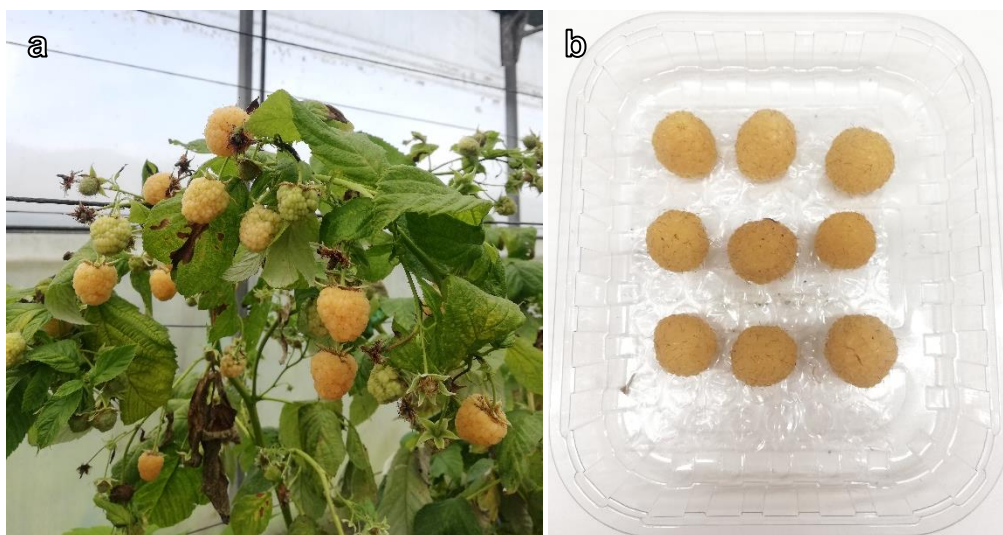
**Figura 7** – Planta do PM1, instalado no PIF.

### *Família 2*

A família 2 (Fam2) resultou do cruzamento entre o PF e o progenitor masculino 2 (PM2). Este genótipo constitui uma cultivar comercial remontante, que se caracteriza por pertencer à espécie *R. idaeus* L., apresentar um porte ereto, ser semi-vigorosa e apresentar elevada precocidade na produção. Assim, o cruzamento que originou esta família teve como principal objetivo tentar introduzir precocidade na produção do genótipo do PF.

### *Família 3*

A família 3 (Fam3) resulta do cruzamento entre o PF e o progenitor masculino 3 (PM3). Este genótipo é parte integrante da coleção de variedades de framboesa mantida no PIF e caracteriza-se por pertencer à espécie *R. idaeus* L., ser remontante e apresentar frutos de coloração amarela. Assim, o cruzamento que originou esta família teve como principal objetivo tentar produzir descendentes com frutos de cor vermelha mais clara. Na Figura 8 é possível observar um exemplar do PM3, instalado no PIF, bem como os seus frutos.



**Figura 8** – Planta (a) e frutos (b) do PM3, instalado no PIF.

### *Hibridações*

Para a produção e obtenção das descendências das 3 famílias, foram realizadas hibridações entre o PF e o PM1, PM2 e PM3, em 2021, no PIF.

Depois de produzidos os frutos, estes foram colhidos, as sementes separadas da polpa e armazenadas até à fase de germinação e sementeira.

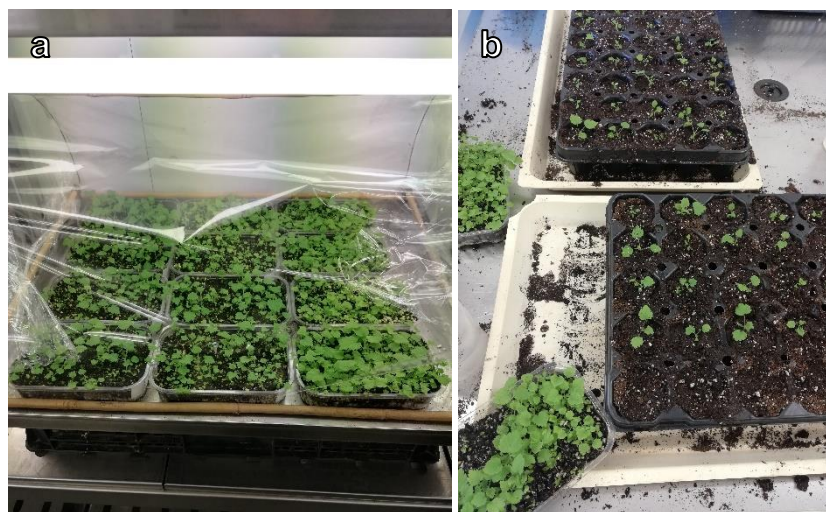
### *Germinação e desenvolvimento inicial*

Antes de se proceder à germinação das sementes, é necessário realizar um pré-tratamento de escarificação e estratificação, para aumentar a rapidez e uniformidade de germinação (Ourecky, 1975). A escarificação torna a semente permeável, fazendo com que seja capaz de absorver água e oxigénio, e a estratificação satisfaz as necessidades em frio das sementes para quebra de dormência e início do desenvolvimento (Daubeny, 1966). Esta fase do processo foi realizada nas instalações do polo de Oeiras do INIAV, I.P.

A escarificação foi efetuada mergulhando as sementes em ácido sulfúrico durante 15 minutos. Estas foram posteriormente lavadas com água e estratificadas em sacos plásticos com substrato Siro® Germinação Biológico com perlite, na relação 1:1. Os sacos foram em seguida colocados numa câmara de frio, a 4 °C, com ambiente húmido, durante 4 semanas. Após este período, as sementes foram semeadas em cusetes de plástico com 680 cm<sup>3</sup> de capacidade, em substrato Siro® Germinação Biológico com perlite, na relação 2:1. As cusetes foram colocadas numa câmara de fito-clima (Figura 9), com temperatura de 25 °C dia/20 °C noite, fotoperíodo 16 h dia/8 h noite e HR elevada, para promover a germinação, no dia 7 e 28 de fevereiro de 2022.

As transplantações das plântulas germinadas iniciaram-se a 28 de fevereiro e decorreram até dia 7 de abril de 2022. As plântulas que apresentavam, no mínimo, duas folhas verdadeiras completamente expandidas foram transplantadas para tabuleiros (Figura 9) constituídos por

40 alvéolos (5 x 8) de 130 mL, com substrato Siro Multiplicação e regadas com água imediatamente a seguir.



**Figura 9** – Plântulas de framboesa germinadas prontas para transplantação, em cusetes de germinação na câmara de fito-clima (a); plântulas de framboesa transplantadas para tabuleiros de alvéolos de 130 mL (b).

Os tabuleiros foram posteriormente colocados na estufa, durante aproximadamente 2 meses, até que as plantas estivessem desenvolvidas o suficiente para serem transportadas e instaladas no PIF. Durante esse período, as plantas foram fertirrigadas diariamente, de forma manual, com uma solução nutritiva com condutividade elétrica (CE) entre os 0,8 e os 1,2 dS/cm e pH 6.

#### *Instalação das plantas no PIF*

As plântulas transplantadas permaneceram na estufa das instalações do INIAV., I.P., polo de Oeiras, durante aproximadamente 1 mês, no caso das famílias 2 e 3, e 2 meses, no caso da família 1. Após estes períodos, foram transferidas para o PIF, ao longo de diferentes datas (Quadro 1). O material vegetal foi instalado em túneis de polietileno (Figura 10), do tipo espanhol sem caleiras, com 20 m de comprimento por 6,5 m de largura, cada um contendo 3 linhas e estando agregado em grupos de 3 túneis por bateria. As linhas possuem uma armação em madeira com um sistema de arames que permite a condução vertical das plantas, têm o solo revestido com tela preta e um sistema gota-a-gota para fertirrega (Figura 10). As plantas foram instaladas em vasos de 4,7 L, em substrato de fibra de coco, numa densidade de 5 plantas por metro linear, o que corresponde a, em média, 95 plantas por linha, com um espaçamento de aproximadamente 20 cm entre si.



**Figura 10** – Túnel de polietileno instalado no PIF (a); pormenor de duas linhas com plantas de framboesa instaladas, dentro do túnel (b); distribuição espacial da Fam1 (cor de laranja), da Fam2 (verde) e da Fam3 (cor-de-rosa) nas baterias (c, a figura não está à escala).

**Quadro 1** – Datas de instalação das plantas das três famílias, no PIF, durante o ano de 2022.

<b>Família</b>	<b>Fam1</b>		<b>Fam2</b>			<b>Fam3</b>		
<b>Data de instalação</b>	26/mai	08/jun	06/abr	21/abr	11/mai	06/abr	21/abr	24/mai

### 3.3. Ferrugem

#### 3.3.1. Inoculação

De forma a avaliar a resposta de cada indivíduo da Fam1 à infeção por *Thekopsora americana*, as plantas jovens<sup>6</sup> desta família foram inoculadas com esporos do respetivo fungo, nas instalações do INIAV, I.P., polo de Oeiras. As inoculações foram realizadas em duas fases: a primeira, a que se dará o nome de ‘pré-ensaio’, teve o principal objetivo de testar algumas variações da metodologia de inoculação, de forma a definir a mais eficaz e eficiente; a segunda, a que se dará o nome de ‘ensaio’, consistiu na aplicação da metodologia estabelecida na fase de pré-ensaio, com vista à avaliação da resposta das plantas à tentativa de infeção pelo fungo e progressão da doença da ferrugem tardia.

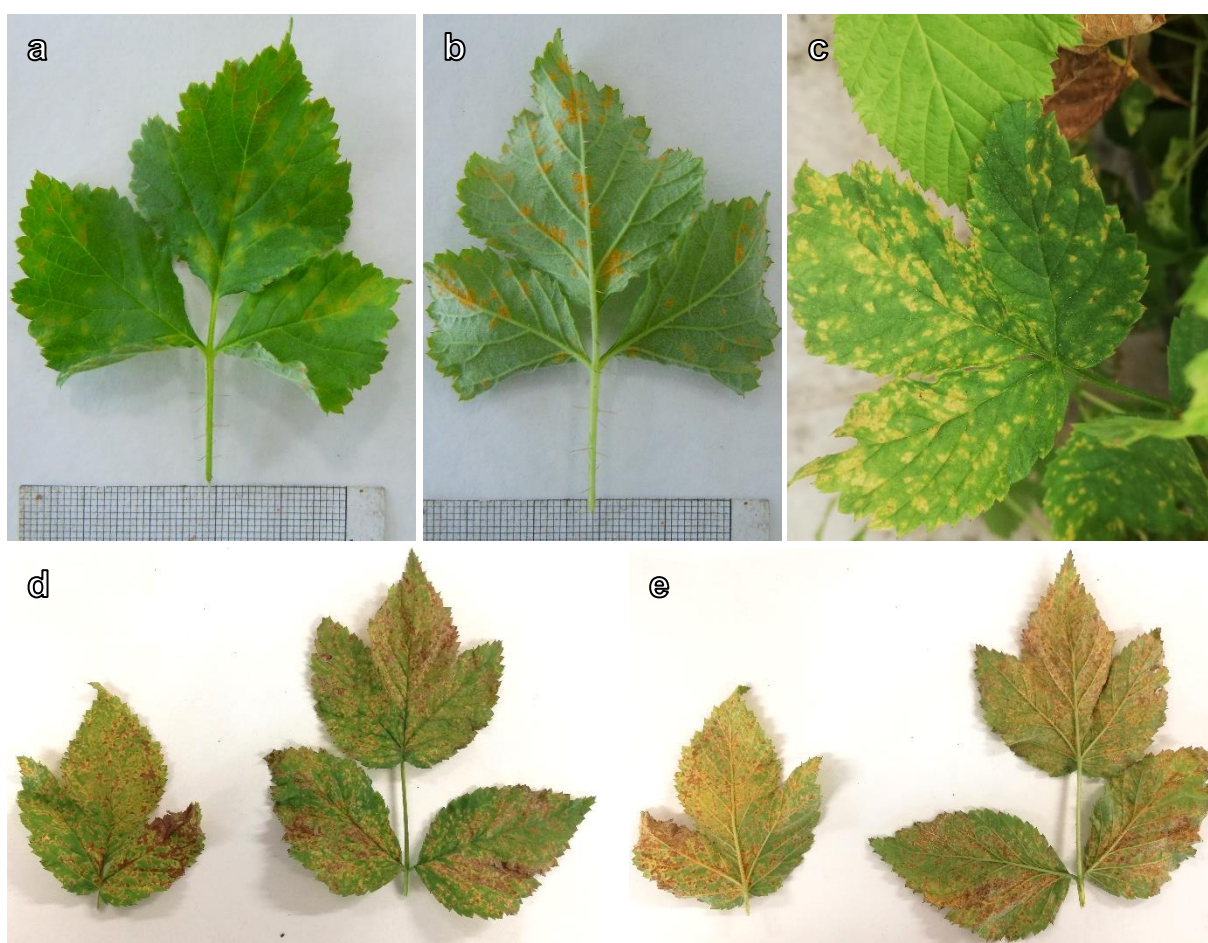
#### Pré-ensaio

A fase de pré-ensaio foi realizada em duas datas: nos dias 28 de março e 7 de abril de 2022.

<sup>6</sup> A inoculação foi realizada em plantas com 19 a 40 dias após transplantação das cusetes de germinação para os tabuleiros alveolados.

Na primeira data, foram inoculadas 4 plantas com 19 dias após transplantação.

Foi utilizado inóculo fresco, identificado em plantas infetadas com *T. americana*. Devido à reduzida quantidade de esporos presentes nas folhas, não foi possível recolher inóculo monopustular para identificação do fungo e inoculação, tal como mencionado na bibliografia (Jamieson & Nickerson, 1999; Ribeiro & Spósito, 2022). No entanto, a sintomatologia observada nas folhas da planta de onde foi realizada a colheita de esporos (Figura 11) era coincidente com a de ferrugem tardia de framboeseira. Adicionalmente, ao contrário da ferrugem causada por *Phragmidium rubi-idaei*, que produz espermátogónios e aécios na página superior das folhas, só foram observados uredínios na página inferior das folhas, cujas características morfológicas eram consistentes com *T. americana*. Assim, considerou-se que os esporos observados e colhidos eram de *T. americana*.



**Figura 11** – Sintomas provocados por ferrugem tardia nas páginas superior (a, c, d) e inferior (b, e) das folhas de framboeseira utilizadas para colheita de esporos.

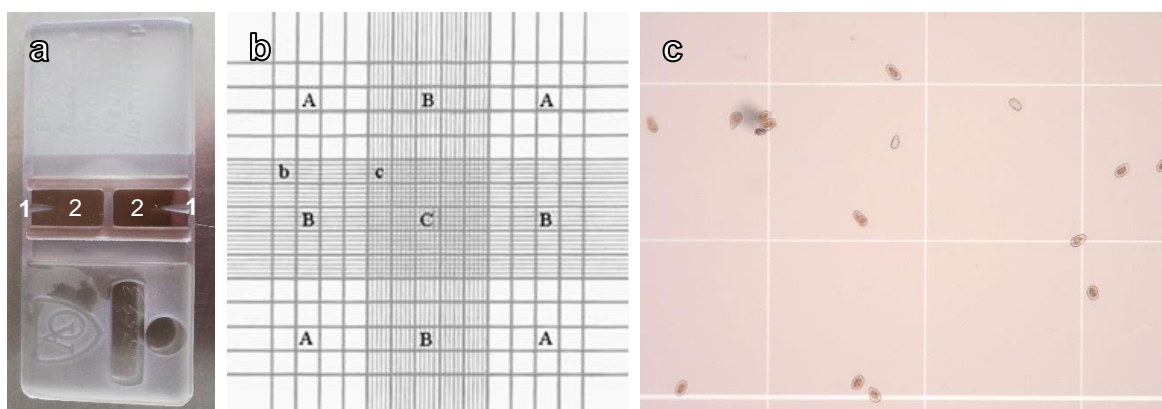
Para a preparação da suspensão de esporos para inoculação, foram colhidas várias folhas que apresentavam esporos maduros. Estas foram lavadas com água destilada estéril para uma placa de Petri, tendo os esporos remanescentes sido varridos com recurso a um pincel. A concentração da suspensão de esporos foi determinada através de um hemocitómetro (Figura 12). Com o auxílio de uma micropipeta, colocou-se uma gota da

suspensão de esporos em cada um dos poços do hemocitómetro e procedeu-se à contagem dos esporos nos 4 quadrantes da grelha A<sup>7</sup>, ao microscópio, numa ampliação de 400x (Figura 12). A concentração ( $C$ ) de esporos na suspensão (esporos/mL) é dada pela seguinte expressão:

$$C = \bar{x}_i \times 10^4,$$

Onde  $\bar{x}_i$  corresponde à média do número de esporos nos quatro quadrantes ( $i = 1, 2, 3, 4$ ).

A suspensão de esporos foi posteriormente diluída com água destilada estéril até se obter uma concentração de, aproximadamente,  $5 \times 10^4$  esporos/mL, uma vez que a concentração reportada por diferentes autores como sendo eficaz para inoculações desta espécie de ferrugem varia entre  $3 \times 10^4$  esporos/mL e  $10^5$  esporos/mL (Jamieson & Nickerson, 1999; Luffman & Buszard, 1989; Ribeiro & Spósito, 2022).



**Figura 12** – Hemocitómetro composto pelos poços (1) e grelhas (2) (a); pormenor da grelha constante do hemocitómetro e representação dos diversos quadrantes (b); esporos de *T. americana* na secção A da grelha do hemocitómetro, vistos ao microscópio com uma ampliação de 400x (c).

Nesta primeira data, foi utilizado um pincel para aplicar a suspensão de esporos nas folhas. Apesar de os estomas estarem concentrados na página inferior, uma vez que esta está coberta por tricomas, foram pinceladas ambas as páginas da folha completamente expandida mais velha, com o objetivo de aumentar a probabilidade de inoculação. O tabuleiro contendo as plantas foi, de seguida, coberto com um saco de plástico, para potenciar um ambiente de elevada HR, e colocado numa câmara de fito-clima, a 20 °C, durante 48 horas. Estas são as condições ideais para a germinação dos esporos e inoculação dos tecidos, descritas pelos autores referenciados nesta secção. Findas as 48 horas, a placa foi retirada da câmara e colocada em condições de iluminação natural, a uma temperatura de aproximadamente 20 °C, durante 7 dias, para permitir o desenvolvimento do fungo e aclimatização das plantas,

<sup>7</sup> Considerou-se o setor A da grelha uma vez que os esporos de *T. americana* apresentam uma dimensão suficientemente grande.

antes de serem transferidas para a estufa de quarentena (sem ambiente controlado), onde foi avaliado o desenvolvimento da ferrugem.

Na segunda data de inoculação foram selecionadas 80 plantas com 38 dias após transplantação. O processo de inoculação foi implementado de forma bastante semelhante àquele descrito supra, à exceção de 4 aspetos:

1. As plantas utilizadas estavam mais desenvolvidas, o que se demonstrou mais eficaz para a inoculação e desenvolvimento do fungo, para além da maior resiliência das folhas e plantas;
2. Para a colheita de esporos, as folhas foram apenas varridas para uma placa de Petri e os esporos posteriormente depositados para um tubo Falcon, em vez de lavadas com água destilada. Esta técnica resulta num maior aproveitamento de esporos, que, por serem bastante hidrofóbicos, quando lavados com a água destilada ficavam agarrados à placa de Petri e uma elevada quantidade era desaproveitada;
3. A aplicação da suspensão de esporos nas folhas foi realizada com um borrifador, em vez de um pincel, o que permitiu que esta fosse distribuída de forma mais uniforme na folha e que a aplicação decorresse de forma mais célere;
4. O tempo de permanência das plantas na câmara de fito-clima foi reduzido para 24 horas, uma vez que as condições de elevada humidade contribuíram para uma elevada incidência de podridão nas plantas.

Conclui-se que estas alterações contribuíram para a otimização e aumento da eficácia do processo, pelo que foram implementadas, posteriormente, na fase de ensaio.

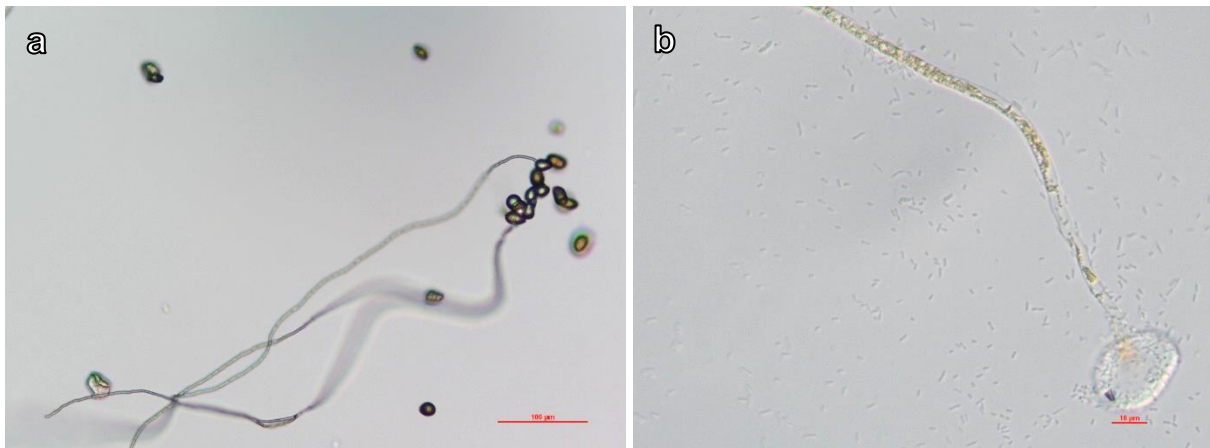
### *Teste de viabilidade*

De forma a aferir a viabilidade dos esporos utilizados na inoculação, procedeu-se a um teste de viabilidade em todas as datas de inoculação. A suspensão foi borrifada de forma uniforme em duas placas de Petri com agar de água a 2%. As placas foram seladas com Parafilm® e colocadas na câmara de fito-clima, nas mesmas condições que as plantas inoculadas, para promover a germinação dos esporos. Após 23 horas, as placas foram observadas ao microscópio com uma ampliação de 400x e, sempre que possível, foram observados 400 esporos por placa<sup>8</sup>, sendo contabilizados os esporos germinados<sup>9</sup> e não germinados. A percentagem de germinação corresponde à razão entre o número de esporos germinados e o total de esporos observados, sendo indicativa da sua viabilidade. Na Figura 13 é possível observar esporos germinados e não germinados.

---

<sup>8</sup> Quando não se verificou a possibilidade de analisar 400 esporos por placa, foram analisados, no mínimo, 100 esporos por placa.

<sup>9</sup> Considerou-se que um esporo estava germinado quando o comprimento do tubo germinativo era igual ou superior ao diâmetro do esporo (Zadoks & Schein, 1979).



**Figura 13** – Esporos germinados e não germinados de *T. americana*, vistos ao microscópio com uma ampliação de 400x (a); pormenor de um esporo germinado com o conteúdo celular movimentado para o tubo germinativo, visto ao microscópio com uma ampliação de 1000x (b).

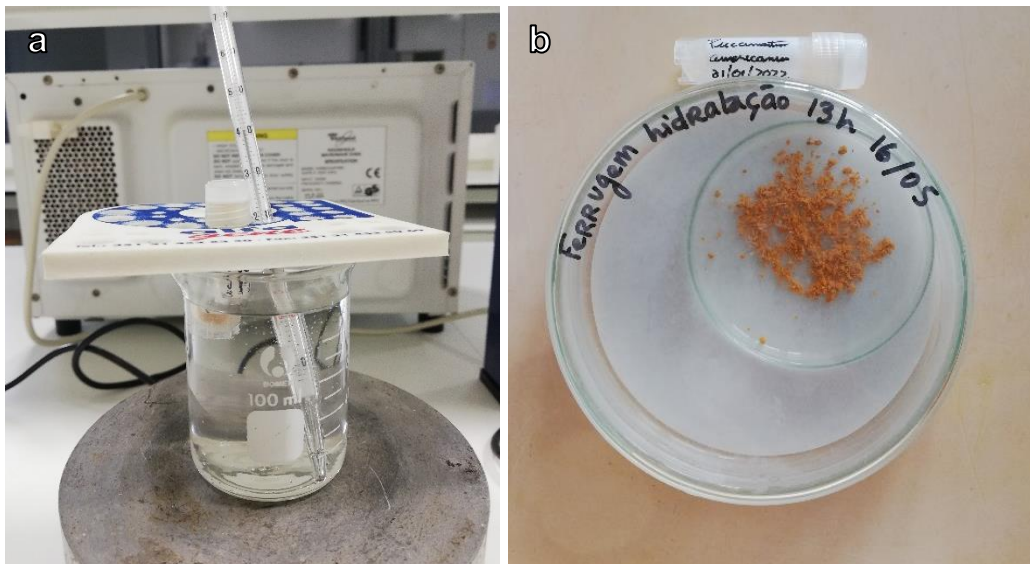
### Ensaio

O momento de inoculação das plantas foi definido com base em 3 fatores: a idade das plantas, a capacidade da câmara de fito-clima, que consegue acomodar no máximo 6 tabuleiros de 40 alvéolos, e a capacidade de avaliar e processar os dados de progressão da doença (descritos na próxima secção) em tempo útil.

Nesta fase, foram inoculadas 892 plantas, em 6 datas diferentes: 21, 27 e 28 de abril e 4, 12 e 17 de maio de 2022.

O método de inoculação utilizado para todas as datas foi o mesmo que o descrito para a segunda data do pré-ensaio. Apenas para as inoculações realizadas a 12 e 17 de maio foi efetuada uma alteração relativamente à fonte de inóculo utilizada: a disponibilidade e viabilidade de inóculo fresco, colhido de folhas infetadas, reduziu bastante desde o início de maio, pelo que se recorreu à utilização de inóculo colhido em janeiro de 2022 e armazenado a - 80 °C.

O processo de descongelação e hidratação dos esporos foi realizado tal como descrito por Alves et al. (2018) e Furtado et al. (2007). Imediatamente após serem retirados da câmara de frio, os esporos foram rapidamente descongelados por imersão num banho de água a 40 °C, durante 7 minutos, com recurso a um gobelé, um flutuador, um termómetro e um aquecedor magnético IKAmag RCT (Figura 14). Em seguida, os esporos foram espalhados na base de uma placa de Petri de 6 mm de diâmetro, que foi por sua vez colocada dentro de outra placa de Petri, com 90 mm de diâmetro. Na base da placa de Petri de maior dimensão, foi colocado um disco de papel de filtro, humedecido com água destilada (Figura 14). A placa foi tapada, selada com Parafilm© e colocada na câmara de fito-clima, nas mesmas condições em que são colocadas as plantas inoculadas, durante 24 horas, de forma a reidratar os esporos.



**Figura 14** – Tubo com esporos de *T. americana* submerso num gobelé, em banho de 40 °C (a); esporos descongelados em placa de Petri com disco de papel de filtro hidratado (b).

### 3.3.2. Avaliação da evolução da ferrugem e quantificação da resistência em estufa

O período mínimo de incubação para *T. americana* descrito na bibliografia (Luffman & Buszard, 1989; Ribeiro & Spósito, 2022) é de 7 a 8 dias após inoculação. A evolução do aparecimento de sinais da doença foi monitorizada diariamente após esse período. Dez dias após inoculação, quando era possível observar a olho nu a esporulação do fungo, agregada em pústulas, na página inferior da maioria das plantas, as folhas inoculadas foram colhidas para serem digitalizadas e ser calculada a severidade da doença. A digitalização foi realizada com recurso à digitalizadora *HP Scanjet 5530 Photosmart Scanner* e a medição da área total das folhas (cm<sup>2</sup>) e da área lesionada (cm<sup>2</sup>) (Figura 15) pela esporulação do fungo foi realizada com recurso ao software de processamento e análise de imagem *ImageJ versão 1.53* (Rasband, 2022). Posteriormente, foi calculada a severidade para cada folha inoculada, que corresponde ao rácio entre a área lesionada e a área total da folha.



**Figura 15** – Análise da área lesionada de uma folha de framboeseira inoculada com *T. americana*, através do software *ImageJ* (versão 1.53).

De acordo com a severidade calculada para cada folha, as respectivas plantas foram divididas em 3 classes de resistência/suscetibilidade relativamente à ferrugem tardia (Quadro 2).

**Quadro 2** – Classificação de resistência/suscetibilidade de plantas de framboesa em função da severidade nas respectivas folhas inoculadas.

<b>Intervalo de Severidade</b>	<b>Classe de Resistência</b>
0 – 8 %	Resistente
8 – 40 %	Intermédio
40 – 100 %	Suscetível

A classificação foi baseada na classificação implementada pelo departamento de fitopatologia do ministério de agricultura da Austrália, que estabelece a relação entre a severidade de ferrugem amarela (*Puccinia striiformis* Westend.) em folhas de trigo e a classificação da resistência à doença, bem como na realizada por outros autores, maioritariamente em cereais (Bender et al., 2016; Díaz-Lago et al., 2003; Field Crop Diseases Victoria, 2022; Stubbs et al., 1986).

Para efetuar a seleção, foi adotada uma abordagem conservadora: dentro da classe das plantas classificadas como resistentes, foram selecionadas aquelas que apresentaram um valor de severidade até 5% e descartadas as restantes. Estes génotipos foram monitorizados, na estufa de quarentena, durante mais 10 dias após a avaliação da severidade, após os quais o nível de infeção da planta foi classificado numa escala de 0 a 3 (imagens constantes do Anexo I):

- 0 – ausência de pústulas e esporulação;
- 1 – pústulas com esporulação muito incipiente e muito baixa densidade;
- 2 – pústulas com esporulação evidente, de dimensão e densidade intermédia;
- 3 – pústulas evidenciando forte esporulação, de dimensão apreciável e elevada densidade.

Ao fim dos 10 dias, as plantas selecionadas foram instaladas no PIF, nas mesmas condições que as restantes famílias.

### **3.3.3. Avaliação da resistência de campo**

De forma a complementar a avaliação realizada em estufa, foi realizada uma avaliação das plantas selecionadas, no campo. No dia 26 de outubro de 2022, foram colhidas seis folhas de 30 plantas por família, escolhidas aleatoriamente. Foram igualmente colhidas 6 folhas de 3 indivíduos do PF e do PM1. Uma vez que o PF é o mesmo para as três famílias, foram também colhidas 6 folhas de 30 plantas aleatórias da Fam2 e da Fam3, com o objetivo de comparar os seus resultados com os da Fam1. Tal como efetuado na avaliação em estufa, as

folhas foram digitalizadas e, com recurso ao software *ImageJ* versão 1.53, foram medidas a área total da folha (cm<sup>2</sup>) e a área das lesões (cm<sup>2</sup>) para calcular a severidade.

### 3.3.4. *Análise dos dados*

Para os dados recolhidos na primeira avaliação, em estufa, foram calculados indicadores estatísticos descritivos para os valores de severidade resultantes das diferentes datas de inoculação.

Com os dados da segunda avaliação, realizada em campo, no PIF, foi efetuada uma análise de variância (ANOVA) a um fator, com o objetivo de detetar diferenças significativas entre a severidade calculada para as 3 famílias e ambos os progenitores ( $p < 0,05$ ). Mediante a deteção de diferenças significativas, efetuou-se um teste de *Tukey* de comparação de médias, com o mesmo nível de significância.

Todas as análises foram efetuadas com recurso ao software estatístico *R* versão 4.2.2 (R Core Team, 2022).

## 3.4. *Precocidade*

A Fam2 foi avaliada com o objetivo de identificar genótipos mais precoces que o PF.

### 3.4.1. *Registo da fenologia*

A partir do dia 6 de julho de 2022, foi monitorizado e registado, semanalmente, o estado fenológico de todos os indivíduos da Fam2. A última data de monitorização efetuou-se 130 dias após a data de plantação, uma vez que foi esse o período compreendido entre a plantação e a produção do PF, registado para o ano de 2021. No Quadro 3 estão identificadas as últimas datas de monitorização mediante a data de plantação dos indivíduos da Fam2.

**Quadro 3** – Datas de plantação dos indivíduos da Fam2 e respetiva data da última monitorização, efetuada 130 dias após aquela.

<i>Data de plantação</i>	<i>Data da última monitorização</i>
06/04/2022	14/08/2022
21/04/2022	29/08/2022
11/05/2022	18/09/2022

Relativamente aos estados de desenvolvimento das plantas, foi registada a data de observação de quatro estados fenológicos principais, observados para o meristema apical da planta:

- **Vegetativo**, que compreende todas as fases de desenvolvimento vegetativo, antes que seja observado qualquer primórdio de formação de botão floral no meristema apical;
- **Botão**, que corresponde ao momento a partir do qual é possível observar, a olho nu, a formação inicial de botão floral no meristema apical da planta;
- **Queda da pétala**, que marca o fim da receptividade do estigma para polinização e o início do desenvolvimento do fruto, caso tenha havido fecundação dos óvulos, e na qual é possível observar uma maior separação entre os estames e queda de uma a mais pétalas;
- **Colheita do *king fruit***, que é a denominação que se dá ao fruto apical da planta, geralmente o primeiro a desenvolver-se e a atingir a maturação completa.

No Anexo II é possível observar a representação fotográfica de cada estado e dos estados intermédios relativos ao meristema apical.

### 3.4.2. *Medições biométricas*

Nos indivíduos que apresentaram uma produção mais precoce ou igual à do PF, foram medidos a altura total da planta (cm), a altura até ao primeiro lateral produtivo (cm) e o número de laterais produtivos. Foi também calculada a densidade de laterais produtivos em função do comprimento total.

### 3.4.3. *Grupos de Precocidade*

Depois de identificados todos os genótipos que apresentaram uma produção mais precoce ou igual à do PF, foram calculados o tempo – em dias e semanas, que cada um demorou a atingir a colheita do *king fruit*, desde a respetiva data de plantação, bem como o somatório de graus-dia de crescimento (GDC), para o mesmo período.

O somatório de GDC foi calculado através dos dados de temperatura fornecidos pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), I.P., referentes à estação meteorológica de Odemira – São Teotónio, para o período compreendido entre abril e setembro de 2022. A temperatura de base para o cálculo deste indicador foi de 5 °C, como referenciado na bibliografia (Black et al., 2008; Hoover et al., 1989; Oliveira et al., 2004).

Dentro da mesma data de plantação, os indivíduos foram agregados em classes de precocidade, de acordo com o número de semanas e GDC acumulados até à data de colheita do *king fruit*.

### 3.4.4. *Análise dos dados*

De forma a caracterizar cada grupo de precocidade e a compará-los entre si relativamente às variáveis biométricas medidas e mencionadas na secção 3.4.2, foi efetuado um teste não-paramétrico de *Kruskal – Wallis* ( $p < 0,05$ ). Este teste é efetuado quando não se cumprem

satisfatoriamente os pressupostos da ANOVA para os dados da amostra em estudo (por exemplo, o pressuposto da normalidade) e permite avaliar se há diferenças entre as medianas de diferentes grupos. No caso do número de laterais produtivos, a variável utilizada no teste foi o valor da sua raiz quadrada, para a transformar numa variável contínua.

Uma vez que alguns grupos eram constituídos por apenas um ou dois indivíduos, estes foram agregados ao grupo mais próximo, de forma a que a sua dimensão fosse estatisticamente aceitável para a realização do teste.

### **3.5. Cor**

#### **3.5.1. Coordenadas CIE**

Os frutos dos indivíduos da Fam3 foram avaliados com o objetivo de comparar a sua coloração com a dos frutos do PF.

A colheita de frutos para análise da cor iniciou-se no dia 25 de agosto de 2022, na primeira planta a apresentar frutos maduros, e foi efetuada em todas as plantas que apresentaram quantidade suficiente de frutos maduros até ao dia 27 de outubro de 2022, no PIF. Para cada planta foram colhidos 3 frutos, em três datas diferentes, no estado comercial de maturação – momento em que o fruto apresenta coloração em todas as drupéolas e em que se separa do recetáculo sem ser danificado. Estes foram acondicionados em cuvetes de plástico, que, por sua vez, foram colocadas em arcas térmicas a uma temperatura de 4 °C, que constituíram as condições do seu transporte para o laboratório de Horticultura do ISA. Aqui, foram colocados no frigorífico, a uma temperatura igualmente de 4 °C, até serem medidos, no dia seguinte.

Os parâmetros da cor foram medidos com recurso a um colorímetro portátil Chroma-Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Americas Inc.; Figura 16). Este aparelho mede a cor em 3 coordenadas que reportam a um sistema internacional de cor standardizado, desenvolvido pela *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE):

- $L^*$ : mede a luminosidade numa escala de 0 (branco) a 100 (preto) e é uma variável acromática;
- $a^*$ : mede o valor cromático num eixo que vai de verde ( $-a = -60$ ) a vermelho ( $+a = +60$ );
- $b^*$ : mede o valor cromático num eixo que vai de azul ( $-b = -60$ ) a amarelo ( $+b = +60$ ).

Estas 3 variáveis posicionam uma determinada cor num espaço tridimensional de 3 eixos ortogonais.



**Figura 16** – Medição da cor de frutos de framboesa com colorímetro portátil Chroma-Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Americas Inc.) (a); mostrador com o valor das coordenadas medidas (b); espaço tridimensional formado pelos 3 eixos formulados pelo CIE (c) (Ly et al., 2020).

O aparelho foi calibrado em todas as datas, antes de serem iniciadas as medições, com recurso a uma placa de calibração branca (14833002) específica para o efeito, com valores de refletância de  $Y = 84,8$ ,  $x = 0,3157$  e  $y = 0,3215$ .

Utilizando os valores das variáveis medidas, foram calculados os seguintes indicadores (McGuire, 1992):

- $\Delta E_{ab}^*$ , a diferença entre a cor dos frutos de cada indivíduo da Fam3 (a) e a dos frutos de cada um dos progenitores (b), que corresponde à distância, no espaço tridimensional, entre os seus pontos, e é calculada através da expressão:

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2},$$

onde  $\Delta L$  corresponde à diferença do valor de  $L^*$  entre a e b,  $\Delta a$  corresponde à diferença do valor de  $a^*$  entre a e b e  $\Delta b$  corresponde à diferença do valor de  $b^*$  entre a e b;

- $h_{ab}$ , a tonalidade de uma cor, que lhe confere o nome e que corresponde ao ângulo ( $^\circ$ ) que a reta traçada entre a origem dos eixos  $a^*$ ,  $b^*$  e o ponto da respetiva cor forma relativamente ao eixo  $a^*$ . O seu valor é dado pela seguinte fórmula:

$$h_{ab}^0 = \arctan \frac{b^*}{a^*};$$

Valores de  $0^\circ$  ou próximos de  $0^\circ$  correspondem a tonalidades entre roxo e vermelho;  $90^\circ$  correspondem a amarelo;  $180^\circ$  a verde-azulado;  $270^\circ$  a azul (McGuire, 1992);

- $C_{ab}^*$ , a cromaticidade ou saturação de uma cor, corresponde à distância do ponto de cor no espaço bidimensional formado pelos eixos  $a^*$  e  $b^*$  ao eixo  $L^*$ , e é calculado através da seguinte fórmula:

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} .$$

### 3.5.2. *Análise dos dados*

Foram construídos dois gráficos de dispersão: um com os valores de  $b^*$  em função de  $a^*$  e o outro com os valores de tonalidade ( $h^\circ$ ) em função dos valores de luminosidade ( $L^*$ ) de todos os indivíduos da Fam3, bem como do PF e do PM3. Os pontos simultaneamente mais afastados da mãe e mais próximos do pai foram comparados com ambos os progenitores através de uma análise de variância (ANOVA), para aferir se havia diferenças significativas entre a cor dos seus frutos ( $p < 0,05$ ). Quando se verificaram diferenças significativas, foi realizado um teste *Tukey* para comparação de médias, com o mesmo nível de significância.

## 4. Resultados e discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos da análise da característica em estudo das 3 famílias avaliadas.

### 4.1. Família 1: Ferrugem

#### Seleção em estufa

Com a realização do ensaio e do segundo pré-ensaio foram inoculadas, no total, 972 plantas de framboesa, entre 7 de abril e 17 de maio de 2022. Destas, 773 (79,5%) foram avaliadas, 161 (16,6%) morreram – devido a stress hídrico ou podridão, e 38 (3,9%) foram eliminadas por apresentarem fraco desenvolvimento, não permitindo que tivessem folhas com dimensão aceitável para avaliação (Quadro 4).

A totalidade de plantas avaliadas apresentou uma severidade média de 10,3%, uma severidade mínima de 0,2% e uma severidade máxima<sup>10</sup> de 46,8%.

Das 773 plantas avaliadas, foram selecionadas 78, correspondentes a 10,1% do total de avaliadas, com severidade máxima de 5% e nível de infeção no resto da planta entre 0 e 1. A severidade média desta seleção foi de 3%.

**Quadro 4** – Categorização do número total de plantas inoculadas e respetivo valor de severidade média (SM, %), severidade mínima (Smin, %) e severidade máxima (Smax, %).

	<b>Número</b>	<b>Proporção</b>	<b>SM</b>	<b>Smin</b>	<b>Smax</b>
Plantas Selecionadas	78	10,1% <sup>1</sup>	3,0%	0,2%	4,9%
Plantas Rejeitadas	695	89,9% <sup>1</sup>	11,1%	0,4%	46,8%
<b>Plantas Avaliadas</b>	<b>773</b>	<b>79,5%<sup>2</sup></b>	<b>10,3%</b>	<b>0,2%</b>	<b>46,8%</b>
<b>Mortas</b>	<b>161</b>	<b>16,6%<sup>2</sup></b>			
<b>Eliminadas</b>	<b>38</b>	<b>3,9%<sup>2</sup></b>			
<b>Total</b>	<b>972</b>	<b>100%</b>			

<sup>1</sup> Em relação ao número de plantas avaliadas;

<sup>2</sup> Em relação ao número total de plantas inoculadas.

No grupo de plantas rejeitadas observa-se um valor de severidade mínima de 0,4%, inferior ao limite de seleção de 5%. Isto deve-se ao facto de, no segundo momento de avaliação, plantas que apresentaram valores de severidade baixos, terem apresentado desenvolvimento da doença correspondente a um nível superior a 1 (Anexo I).

Na Figura 17 é possível observar os valores médios, mínimos e máximos da severidade registada nas plantas inoculadas, para cada data de inoculação. É importante referir que, idealmente, as plantas teriam sido inoculadas todas na mesma data, ou em datas consecutivas, para que se verificassem as mesmas condições ambientais de incubação e

<sup>10</sup> Os valores de severidade mínima e máxima correspondem às plantas para as quais se registou o valor mais baixo e mais alto de severidade, respetivamente.

desenvolvimento do fungo, na totalidade dos indivíduos. No entanto, inocular 972 plantas num período de tempo tão curto seria impraticável por falta de disponibilidade de infraestruturas que pudessem acomodar a totalidade do material vegetal em simultâneo, de disponibilidade de mão de obra e inóculo. Este facto representa a fonte de algum erro associado à produção dos dados e seleção das plantas.

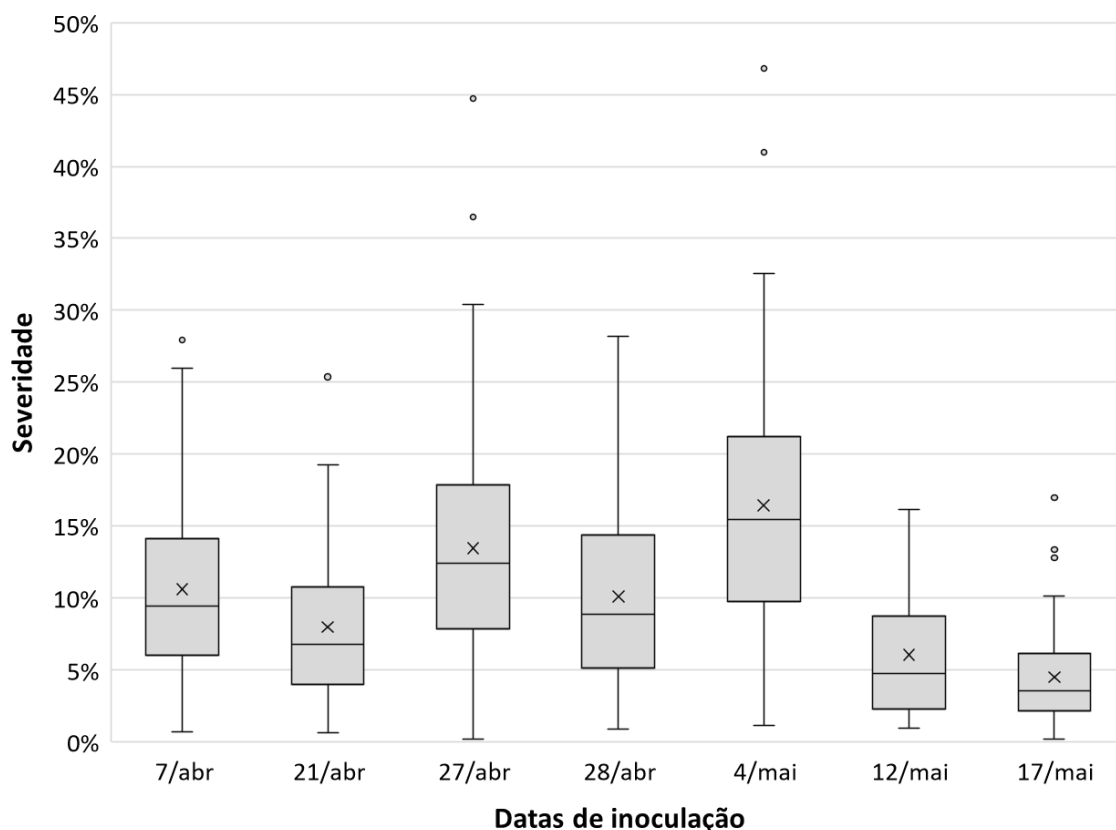
Verifica-se que, para as primeiras quatro datas de inoculação, apesar de se observar alguma variação, a severidade média dos diferentes grupos se aproximou dos 10%, valor em linha com a severidade média apresentada para a totalidade das plantas inoculadas (Quadro 4). Os valores máximos de severidade observados registaram-se para as datas de 27/04 e 04/05. Durante os períodos de desenvolvimento do fungo iniciados nestas datas, as temperaturas máximas diárias mantiveram-se entre os 20 e os 25 °C no distrito de Lisboa (IPMA, 2022a) (Anexo III), que representam a gama de temperaturas ótimas para o desenvolvimento do fungo, potenciando a sua máxima expressão (Ellis et al., 1991; Karunakar et al., 1996; Ribeiro, 2021).

Nas duas últimas datas de inoculação, verifica-se uma redução acentuada na severidade, tanto no valor médio como na amplitude de valores. Este fenómeno dever-se-á ao facto de se ter verificado, para os períodos de incubação e desenvolvimento do fungo iniciados nestas datas, um aumento acentuado na temperatura do ar, para o distrito de Lisboa. Esta atingiu valores na ordem dos 30 °C (IPMA, 2022a), que são reportados como limitantes da expressão máxima do fungo (Karunakar et al., 1996; Ribeiro, 2021). Assim, as plantas avaliadas e seleccionadas que tenham sido inoculadas nestas datas apresentarão menor fiabilidade na sua expressão de resistência, pelo que deverão ser cautelosamente avaliadas, novamente, em condições de campo.

Relativamente à gama de valores de severidade registados em ensaios de avaliação de resistência à doença da ferrugem em diferentes culturas, Stubbs et al. (1986) apresentam uma escala compreendida entre 0 e 37% de severidade de ferrugem em vários cereais, em condições de campo; Bender et al. (2016), Díaz-Lago et al. (2003) e Karunakar et al. (1996) reportaram, em ensaios de estufa, severidades máximas de 33% em sorgo, 54,4% em aveia e 29,6% em trigo, respetivamente; Ribeiro (2021) refere que a severidade máxima de ferrugem tardia observada em plantas de framboesa em condições de campo, no Brasil, é de 43,2%. Assim, a gama de valores apresentada nas 5 primeiras datas de inoculação está dentro daquela reportada na bibliografia, principalmente nas duas datas referidas acima (27/04 e 04/05), onde se verifica a gama mais alargada, sendo atingido o valor máximo de 46,8% nas plantas inoculadas a 04/05.

No que diz respeito à viabilidade dos esporos, apresentada no Quadro 5, verifica-se que esta apresenta uma evolução bastante variável, que se processa de forma paralela à evolução dos valores de severidade ao longo das primeiras quatro datas de inoculação. No entanto, o seu valor é mínimo para as inoculações efetuadas a 4 de maio, que é também a data em que

as plantas inoculadas apresentam a gama mais ampla de valores bem como a média e mediana mais altas. É também bastante elevado para as duas últimas datas de inoculação, onde, como já foi referido, se observa a menor amplitude de valores de severidade. Assim, a capacidade de expressão do fungo em sinais da doença aparenta ser mais afetada pelas condições ambientais de desenvolvimento do que da viabilidade dos esporos.



**Figura 17** – Relação entre a severidade das plantas de framboesa inoculadas e a respetiva data de inoculação. Todas as datas reportam ao ano de 2022.

**Quadro 5** – Valores de viabilidade dos esporos (%) de *T. americana* utilizados na inoculação das plantas de framboesa nas 7 datas.

Data	07/04	21/04	27/04	28/04	04/05	12/05	17/05
Viabilidade	21,51%	16,9%	51,72%	48,54%	12,01%	60,54%	36,97%

O desenvolvimento da doença aparenta estar mais dependente das condições a que os esporos são submetidos para germinação e posteriormente em que o fungo se desenvolve, como evidenciado na Figura 17.

Relativamente ao tipo de resistência possivelmente introduzida através do PM1 na descendência, esta aparenta ser a denominada horizontal ou incompleta, controlada por vários genes menores. Esta hipótese baseia-se em dois tipos de observações. Em primeiro

lugar, no facto de os indivíduos do PM1 terem demonstrado, em condições de campo, níveis de severidade (aferidos visualmente) da doença muito próximos de zero, na generalidade da planta, quando, paralelamente, genótipos instalados ao seu lado apresentavam elevado nível de infeção, com as folhas cobertas de lesões esporulantes. Não se verificaram no PM1, no entanto, reacções de hipersensibilidade – pequenas pontuações cloróticas e ausência de lesões esporulantes. Tal como referido na secção 2.2.2.1, este tipo de reacção é característico de resistência vertical ou completa, conferida por um ou poucos genes maiores (Bariana, 2003; Brown et al., 2014; Luffman & Buszard, 1989; Stubbs et al., 1986). Tal é indicativo, possivelmente, de que o tipo de resistência exibida pelo PM1 será horizontal.

Em segundo lugar, foi possível verificar, nas plantas inoculadas da descendência, severidades numa ampla gama de valores, bem como ausência de reacções de hipersensibilidade. Segundo Bariana (2003), resistência horizontal, que é de transmissão genética mais complexa, produz fenótipos suscetíveis exibindo uma ampla gama de valores de severidade da doença e taxa de desenvolvimento mais lenta. Apesar de não terem sido recolhidos dados relativamente à velocidade de desenvolvimento da doença, a ampla gama de valores de suscetibilidade registados aparentam atestar esta hipótese.

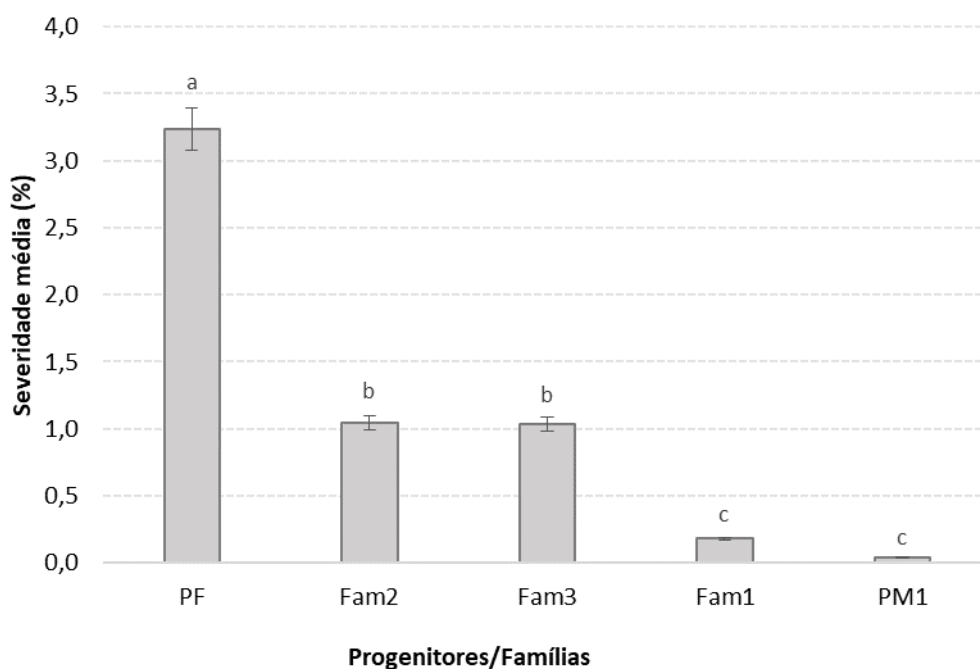
Anthony et al. (1986) estudaram a transmissão de resistência à doença da ferrugem amarela em framboesa, causada pelo fungo *Phragmidium rubi-idaei*, na descendência produzida por um cruzamento dialélico entre 5 cvs. comerciais. Os autores identificaram respostas de resistência bastante distintas entre as diferentes descendências: as cinco famílias originárias de um dos progenitores segregaram para resistência completa (vertical), não apresentando desenvolvimento de quaisquer esporos nos seus tecidos; pelo contrário, as restantes famílias demonstraram diferentes níveis de resistência incompleta (horizontal), tal como referido pelos autores, manifestado por diferentes níveis de severidade da doença e velocidade da sua evolução. Este estudo contribui para fortalecer a hipótese acima proposta, de que a resistência introduzida no ensaio realizado poderá ser incompleta ou horizontal.

No entanto, apesar de os elementos acima referidos apontarem para a forte possibilidade de a resistência introduzida ser regulada pela ação conjunta de genes menores, não é possível afirmar com certeza que tal seja o caso. Para tal, seria necessário recolher dados de outras variáveis de evolução da doença, tais como o período de latência, o tamanho médio das pústulas, o registo preciso do tipo de reacção à doença, bem como a sua evolução ao longo do tempo, em condições ambientais controladas, tal como efetuado por outros autores em ensaios cujo único objetivo se prendia com o estudo dos mecanismos genéticos reguladores de resistência e da sua transmissão à descendência (Anthony et al., 1986; Jamieson & Nickerson, 1999; Luffman & Buszard, 1989).

## **Avaliação de Campo**

De forma a aferir a eficácia relativa da seleção realizada em estufa, foi efetuada uma avaliação de campo com os dois progenitores da Fam1 e as três famílias, uma vez que o PF, que apresenta elevada suscetibilidade à doença da ferrugem tardia, é o mesmo para as três famílias, variando os progenitores masculinos.

Na Figura 18 estão representadas as médias da severidade medidas para as três famílias e os progenitores referidos. A colheita de folhas foi efetuada em outubro, que não corresponde à altura propícia para a máxima expressão do fungo. Nesta altura, os valores de temperatura registados já são bastante abaixo do seu ótimo de crescimento e as plantas já começam a iniciar o processo de senescência das folhas. Isto explica o facto de os valores de severidade medidos serem significativamente mais baixos que aqueles registados para a avaliação em estufa. Ainda assim, foi possível observar diferenças significativas entre famílias e progenitores. De acordo com o que seria expectável, o PF foi aquele que apresentou maiores valores de severidade, significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos das três famílias de descendentes e do PM1.



**Figura 18** – Média da severidade medida para as três famílias e para os dois progenitores da Fam1 (PF e PM1). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ( $p < 0,05$ ).

A Fam2 e a Fam3 apresentam os valores mais altos a seguir ao PF, não apresentando diferenças significativas entre si, mas apresentando diferenças significativas relativamente aos restantes grupos. A Fam1 e o PM1 apresentam os valores mais baixos de severidade,

não apresentando diferenças significativas entre si e apresentando diferenças significativas em relação aos outros grupos. Estes resultados vão ao encontro daquilo que seria expectável, indicando, com algum nível de confiança, que foi possível introduzir resistência à doença da ferrugem tardia na Fam1.

## 4.2. Família 2: Precocidade

### Grupos de Precocidade e GDC

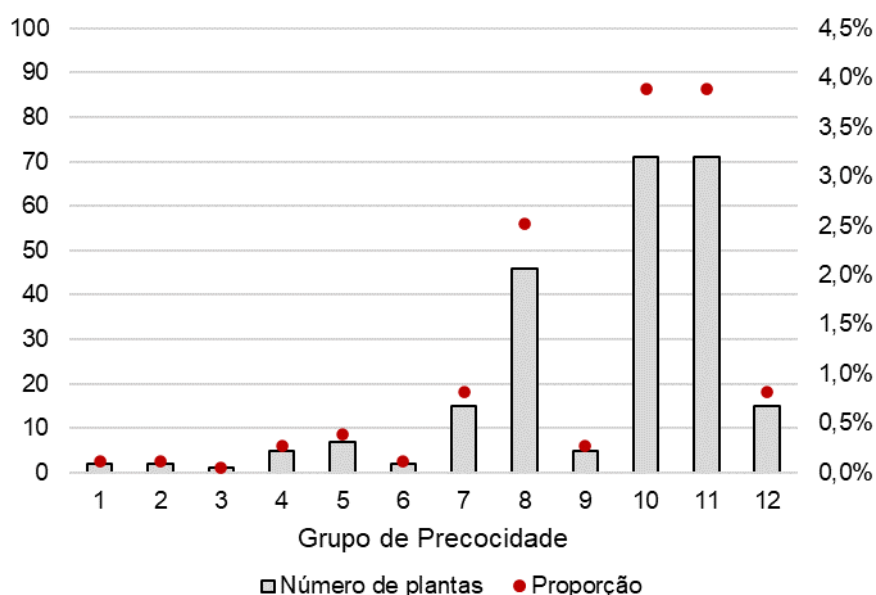
Foram avaliadas, no total, 1827 plantas da Fam2, no PIF, das quais 242 demoraram menos de 130 dias desde a plantação até à colheita do *king fruit*. Ou seja, 13,2% da descendência originária deste cruzamento apresentou produção mais precoce do que o PF.

O Quadro 6 mostra os valores dos indicadores utilizados para separar os indivíduos precoces em diferentes grupos de precocidade, nomeadamente o somatório dos GDC, calculados com uma temperatura base de 5 °C (TB5°C) para o intervalo entre a plantação e a colheita do *king fruit*, bem como a duração desse período em semanas e as respetivas datas de instalação no PIF e colheita. Na Figura 19, por sua vez, está representada a dimensão de cada grupo de precocidade e o peso relativo de cada um na totalidade das plantas avaliadas. No ano de 2022, o período compreendido entre a plantação e a primeira colheita do PF constituiu 128 dias (18,3 semanas), somando 2044,3 GDC (TB5°C).

**Quadro 6** – Grupos de precocidade de plantas de framboesa da Fam2 e respetiva data de plantação, data de colheita, duração do período entre a plantação e a colheita, em semanas, e graus-dia de crescimento (GDC) calculados com TB5°C. Todas as datas reportam ao ano de 2022.

<b>Grupo</b>	<b>Data de Plantação</b>	<b>Data de colheita</b>	<b>Semanas</b>	<b>GDC</b>
<b>1</b>	21/abr	21/jul	13,0	1359,8
<b>2</b>	06/abr	15/jul	14,3	1413,5
<b>3</b>	06/abr	21/jul	15,1	1512,2
<b>4</b>	21/abr	03/ago	14,9	1581,3
<b>5</b>	06/abr	27/jul	16,0	1621,1
<b>6</b>	11/mai	23/ago	14,9	1684,9
<b>7</b>	21/abr	10/ago	15,9	1690,1
<b>8</b>	06/abr	03/ago	17,0	1733,7
<b>9</b>	11/mai	30/ago	15,9	1790,8
<b>10</b>	06/abr	10/ago	18,0	1842,5
<b>11</b>	21/abr	23/ago	17,7	1901,2
<b>12</b>	11/mai	08/set	17,1	1925,7
<b>PF</b>	01/jun	07/out	18,3	2044,3

As plantas que constituem o grupo mais precoce (o grupo 1) foram instaladas a 21 de abril e colhidas 3 meses depois, a 21 de julho, o que corresponde a 13 semanas e um somatório de 1359,8 GDC, aproximadamente 5 semanas antes do PF, relativamente ao ano de 2022, necessitando de menos 684,5 GDC para entrar em produção. Apenas duas plantas constituem este grupo. O grupo 12, o mais tardio, foi instalado a 11 de maio e colhido a 8 de setembro, o que corresponde aproximadamente a 17 semanas e 1925,7 GDC, 1 semana antes do PF, relativamente ao ano de 2022. Os grupos 10 e 11 demoraram mais tempo, em semanas, a produzir do que o grupo 12, mas precisaram de acumular menos horas de temperatura acima dos 5 °C para produzir, o que faz com que sejam fisiologicamente mais precoces.



**Figura 19** – Número de plantas em cada grupo de precocidade e peso relativo de cada um no número total de indivíduos da Fam2.

Através da Figura 19 é possível perceber que os grupos mais precoces são constituídos por um número bastante reduzido de indivíduos, variando entre 1 (grupo 3) e 7 (grupo 5). Pelo contrário, os grupos menos precoces acumulam uma quantidade bastante superior de indivíduos, sendo os grupos 8, 10 e 11 os de maior dimensão, constituídos por 46 e 71 plantas, respetivamente.

Danek (1999) estudou a transmissão de precocidade em cvs. de framboesa remontante através de um cruzamento dialelo completo entre 5 cvs., ao longo dos anos de 1990 e 1991, tendo concluído que as componentes de precocidade são mais afetadas e reguladas por efeitos genéticos aditivos, sendo relativamente fácil introduzir ganhos genéticos para estas componentes em programas de melhoramento. Estas conclusões são corroboradas pelos resultados observados no ensaio de precocidade desta dissertação. O autor verificou também

que genótipos remontantes precoces apresentam elevado potencial para a introdução de precocidade em melhoramento.

### **Parâmetros biométricos**

O Quadro 7 mostra a relação entre os grupos de precocidade originais e os correspondentes grupos agregados usados como input para o teste de *Kruskal-Wallis*.

No Quadro 8 estão representados os resultados da análise de *Kruskal-Wallis* ( $p < 0,05$ ) relativamente à comparação entre os grupos de precocidade no que diz respeito ao comprimento total da planta (CT), ao comprimento desde a base até ao primeiro lateral produtivo (C1LP) e o número de laterais produtivos (NLP), respetivamente, bem como as médias de cada variável, para cada grupo de precocidade agregado.

Relativamente ao comprimento total das plantas (Quadro 8), os resultados observados vão ao encontro daquilo que seria expectável, com a maioria dos grupos menos precoces (8, 5 e 7) a apresentar maiores valores de comprimento total da planta e alguns grupos mais precoces (1 e 3) a apresentar valores médios de CT mais baixos. O grupo 8 é aquele que apresenta o valor mais elevado de CT (216,80 cm) significativamente diferente de todos os outros grupos, seguido pelo grupo 7 (204,43 cm) e pelo grupo 5 (202,34 cm), que não apresentam diferenças significativas entre si. Estes três grupos de precocidade apresentam consistentemente os valores mais elevados para todas as variáveis, inclusivamente para o C1LP – 139,03 cm, 131,71 cm e 128,86 cm para os grupos 8, 7 e 5, respetivamente, e para o NLP – 16,34, 16,21 e 16,31 para os grupos 5, 7 e 8, respetivamente.

**Quadro 7** – Correspondência dos grupos agregados aos grupos de precocidade originais e respetivos valores (médios no caso de grupos agregados) de dias, semanas e GDC (TB5°) desde a plantação até à colheita do *king fruit*.

<b>Grupo Precocidade</b>	<b>Grupo Agregado</b>	<b>Média dias</b>	<b>Média semanas</b>	<b>Média GDC</b>
<b>1</b>	1	95,5	13,6	1386,6
<b>2</b>				
<b>3</b>	2	105	15,0	1546,7
<b>4</b>				
<b>5</b>	3	108	15,4	1653,0
<b>6</b>				
<b>7</b>	4	111	15,9	1690,1
<b>8</b>	5	119	17,0	1733,7
<b>9</b>	6	111	15,9	1790,8
<b>10</b>	7	126	18,0	1842,5
<b>11</b>	8	124	17,7	1901,2
<b>12</b>	9	120	17,1	1925,7

**Quadro 8** – Valores médios do comprimento total das plantas (CT, cm), comprimento desde a base até ao primeiro lateral produtivo (C1LP, cm), número de laterais produtivos (NLP) e da sua raiz quadrada (RQ NLP) de cada grupo de precocidade (GP), respetivo desvio padrão (DP, cm), ordem segundo a análise de *Kruskal-Wallis* ( $p < 0,05$ , Rank) e grupos de separação de medianas.

<b>GP</b>	<b>CT</b>	<b>C1LP</b>	<b>NLP</b>	<b>RQ NLP</b>	<b>NLP/CT</b>
<b>8</b>	216,80 ± 28,23 <b>a</b> <sup>1</sup>	139,03 ± 21,36 <b>a</b>	16,31	4,04 ± 0,24 <b>a</b>	0,07
<b>5</b>	204,43 ± 25,97 <b>b</b>	128,86 ± 18,74 <b>bc</b>	16,34	4,00 ± 0,41 <b>a</b>	0,08
<b>7</b>	202,34 ± 27,61 <b>b</b>	131,71 ± 23,63 <b>b</b>	16,21	4,03 ± 0,32 <b>a</b>	0,08
<b>4</b>	199,33 ± 22,51 <b>bc</b>	122,87 ± 15,44 <b>bcd</b>	15,87	3,90 ± 0,12 <b>ab</b>	0,08
<b>9</b>	176,70 ± 54,04 <b>bcd</b>	116,10 ± 48,76 <b>cde</b>	15,20	3,96 ± 0,10 <b>ab</b>	0,09
<b>2</b>	174,00 ± 18,62 <b>cd</b>	97,17 ± 12,78 <b>ef</b>	15,67	3,98 ± 0,15 <b>ab</b>	0,09
<b>1</b>	157,75 ± 20,02 <b>d</b>	74,50 ± 17,46 <b>f</b>	15,25	3,88 ± 0,36 <b>ab</b>	0,10
<b>3</b>	167,00 ± 31,27 <b>d</b>	99,88 ± 27,62 <b>def</b>	14,13	3,72 ± 0,54 <b>b</b>	0,08
<b>6</b>	145,75 ± 24,97 <b>d</b>	81,50 ± 19,64 <b>ef</b>	15,00	3,87 ± 0,11 <b>b</b>	0,10

<sup>1</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as medianas ( $p < 0,05$ ).

No que diz respeito aos grupos com menores valores de CT, os grupos 6, 1 e 3 apresentam os menores valores, por ordem crescente, de 145,75 cm, 157,75 cm e 167,00 cm, respetivamente, não apresentando diferenças significativamente diferentes entre si nem entre os grupos 2 e 9.

Uma vez que o desenvolvimento em altura dos lançamentos cessa quando o meristema apical inicia o processo de floração (Carew et al., 2003; Funt, 2013; Keep, 1988), seria expectável que os grupos mais precoces apresentassem os valores médios de CT mais baixos, e os menos precoces os valores mais elevados (Keep, 1988), o que não se verifica de forma tão linear, uma vez que os diferentes génotipos apresentam diferentes expressões para o vigor. O grupo 6 (grupo intermédio de precocidade) é aquele que apresenta o valor mais baixo de comprimento total, significativamente diferente do grupo 5 (mais precoce que o grupo 6), que apresenta um dos valores mais elevados. Ao estudarem o efeito do génotipo e da temperatura em seis cvs. comerciais, Sørnsteby & Heide (2010) verificaram, também, que a relação entre precocidade e CT da planta não se processa de forma tão linear. As cvs. que apresentaram maior precocidade apresentaram também valores de CT intermédios, comparativamente às restantes. Os autores verificaram também um efeito significativo ( $p < 0,01$ ) nesta variável da interação entre génotipo e temperatura. Os valores de CT das plantas variaram entre 100,0 e 190,4 cm, uma gama claramente mais baixa que aquela produzida pelas plantas do ensaio em estudo nesta dissertação e mais próxima daquela abaixo referida como normal para cvs. remontantes. Tal pode ser explicado pelo facto de o ensaio realizado por Sørnsteby & Heide (2010) ter sido realizado na Noruega, que apresenta períodos de desenvolvimento mais curtos (devido ao fotoperíodo e temperatura) do que Portugal. Este fenómeno vai ao encontro do referido por Funt (2013), que reporta uma gama

de alturas típicas para cvs. remontantes de 1,3 a 1,6 m, podendo estas, no entanto, alcançar 2 a 5 m em locais com períodos de desenvolvimento mais alargados. Já Keep (1988) indica que os valores típicos de altura para cvs. remontantes variam entre 1,0 e 1,8 m.

Relativamente ao C1LP, o grupo 1 é aquele para o qual se verifica o menor valor – de 74,5 cm, que, mais uma vez, não apresenta diferenças significativas em relação aos grupos 6, 2 e 3. No entanto, relativamente ao NLP, posiciona-se a meio da tabela, com um valor médio de 15,25, que não é significativamente diferente de nenhum dos outros grupos, que apresentam um valor máximo de 16,34 (grupo 5) e mínimo de 14,13 (grupo 3).

No geral, as cvs. remontantes produzem laterais frutíferos nos 10 a 15 nós a contar do ápice da planta (Funt, 2013). Apesar de os valores do NLP não estarem muito afastados destes valores de referência, no mesmo estudo referido anteriormente, a gama de valores médios relativa a esta variável variou entre 17,2 e 26,3 laterais produtivos por planta. Esta é consideravelmente mais elevada que a gama de valores apresentados no Quadro 8, sendo que esta variável é uma das componentes da produtividade da planta (Keep, 1988; Ourecky, 1976; Sønsteby et al., 2009; Sønsteby & Heide, 2010). A segunda cv. mais precoce, 'Polka', apresentou um valor médio de 21,6 laterais produtivos, o segundo mais elevado das seis cvs. A mais precoce, 'Autumn Bliss', por sua vez, apresentou um valor médio de 17,7 laterais produtivos, o terceiro mais elevado (Sønsteby & Heide, 2010). Apesar de os autores terem verificado um aumento do número de laterais produtivos com o aumento da temperatura a que as plantas são sujeitas na fase de pré-floração (abril e maio) em cinco das seis cvs. avaliadas, apenas o efeito do genótipo se mostrou significativo ( $p < 0,01$ ). Os autores concluem, no entanto, que temperaturas na ordem dos 20 a 25 °C, durante o período de pré-floração, no geral, promovem a floração e a frutificação, o que confirma o reportado por outros autores (Carew et al., 2003; Carew et al., 2000b; Kershaw, 1991; Lockshin & D.C. Elfving, 1981; Ourecky, 1976). Paralelamente, a relação entre o número de laterais produtivos e o comprimento total da planta, para os indivíduos avaliados, variou entre 0,07 e 0,10, uma gama bastante inferior à das cvs. avaliadas por Sønsteby & Heide (2010), que variou entre 0,10 e 0,17.

As plantas do ensaio desta dissertação, durante o período de pré floração, foram expostas a temperaturas médias entre os 10 e os 20 °C (Anexo IV), o que poderá explicar, para além de possível regulação genética, os menores valores observados do número médio de laterais produtivos.

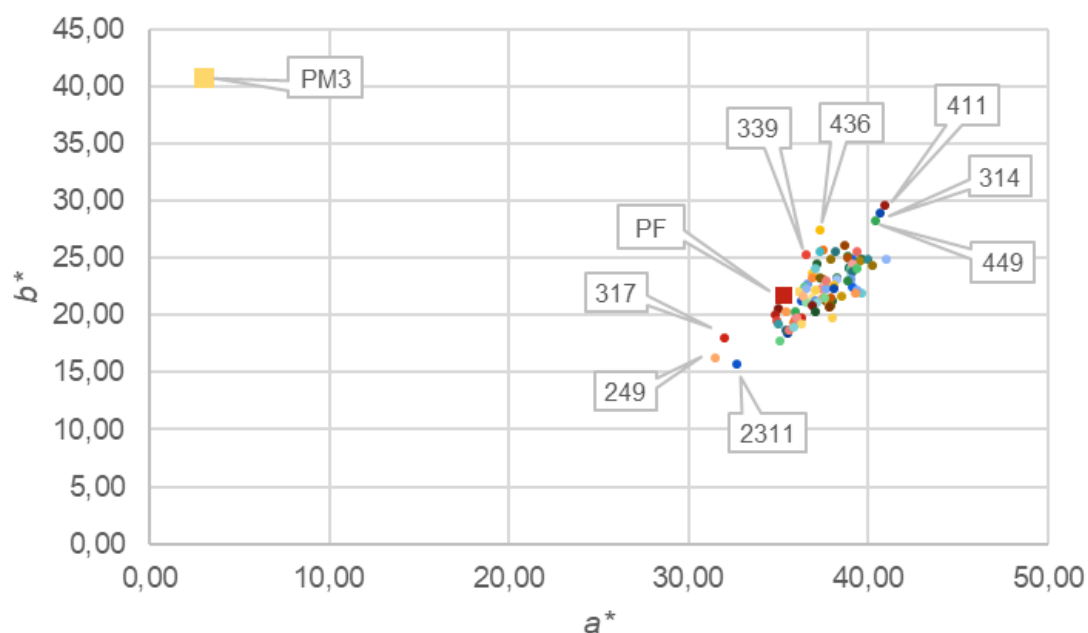
Relativamente ao balanço de todas as variáveis avaliadas para os diferentes grupos de precocidade, aqueles que apresentam o melhor compromisso entre precocidade e parâmetros biométricos seriam, possivelmente, os genótipos do grupo 5, que requerem 1733,7 GDC desde a plantação até à colheita do *king fruit*, menos 310,6 GDC que o PF, e apresentam um CT médio apropriado para as operações culturais.

É importante ressaltar que a seleção se baseia meramente nestas variáveis, não sendo estas definitivas, uma vez que os parâmetros essenciais e finais de seleção se prendem com o rendimento e a qualidade do fruto dos genótipos.

### 4.3. Família 3: Cor do Fruto

Foram instaladas, no total, 464 plantas da Fam3, no PIF, das quais 95 foram avaliadas, entre 25 de agosto e 18 de outubro de 2022, o que corresponde a 20,5% da população. Os frutos dos progenitores foram avaliados a 27 de outubro de 2022.

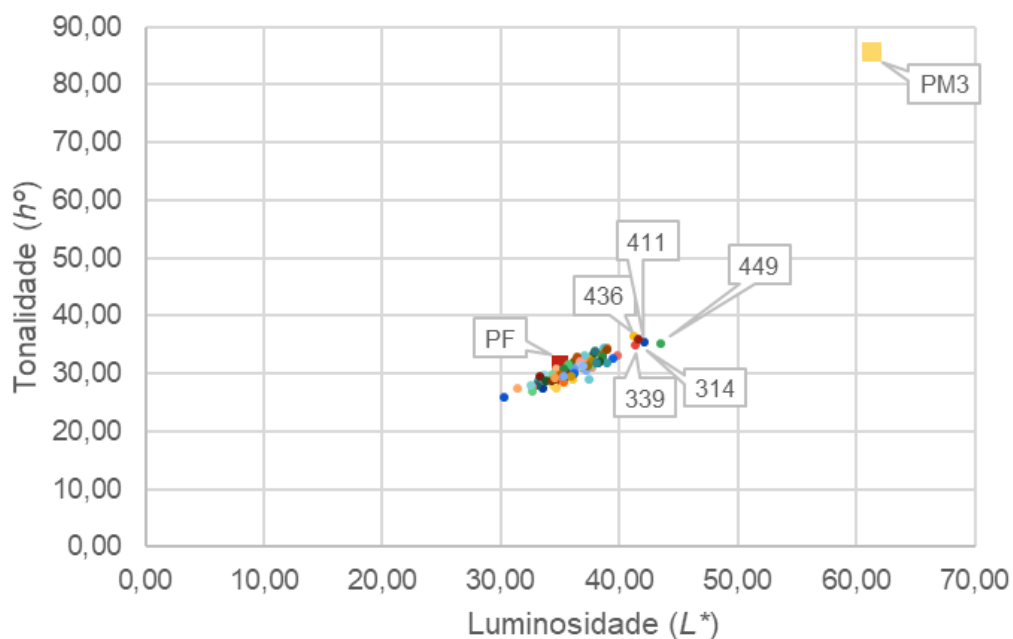
Na Figura 20 é possível observar a distribuição da média de cada planta no que diz respeito aos respectivos valores no eixo vermelho-verde ( $a^*$ ) e amarelo-azul ( $b^*$ ), das 95 plantas avaliadas, bem como dos progenitores, e de como uns se posicionam em relação aos outros. Este tipo de relação não confere informação direta sobre a cor dos frutos, mas permite perceber o posicionamento de cada indivíduo relativamente a cada um dos progenitores.



**Figura 20** – Gráfico de dispersão dos valores médios por planta ( $n=9$ ) no eixo amarelo-azul ( $b^*$ ) em função dos valores no eixo vermelho-verde ( $a^*$ ) das 95 plantas avaliadas da Fam3, do PF e do PM3.

É possível observar que há bastante homogeneidade nos valores representados, estando os indivíduos localizados numa posição bastante próxima do PF e afastada do PM3. É possível verificar, no entanto, alguns pontos mais distantes da nuvem que rodeia o PF, em polos opostos: cinco pontos (314, 339, 411, 436 e 449) posicionam-se mais acima e mais à direita que o PF, o que significa que serão mais vermelhos e, em simultâneo, mais amarelos que o PF; três pontos (249, 317 e 2311) posicionam-se mais abaixo e mais à esquerda que o PF, o que significa que serão menos vermelhos e também menos amarelos que este.

O cálculo da tonalidade (a partir dos valores de  $a^*$  e  $b^*$ ) confere uma medida mais direta da cor como percebida pelo olho humano (McGuire, 1992). Da mesma forma, os valores de luminosidade ( $L^*$ ) também conferem informação bastante direta relativamente à claridade percebida da cor. Assim, na Figura 21 estão representados os valores médios de tonalidade ( $h^\circ$ ) por planta em função do valor médio da respetiva luminosidade ( $L^*$ ). Observa-se uma concentração ainda mais acentuada dos pontos em torno do PF, indicativo de pouca variabilidade relativamente aos indicadores representados.



**Figura 21** – Gráfico de dispersão dos valores médios por planta ( $n=9$ ) de luminosidade ( $L^*$ ) em função dos valores de tonalidade ( $h^\circ$ ) das 95 plantas avaliadas da Fam3, do PF e do PM3. Ângulos de  $0^\circ$  ou próximos de  $0^\circ$  correspondem a tonalidades entre roxo e vermelho;  $90^\circ$  correspondem a amarelo;  $180^\circ$  a verde-azulado;  $270^\circ$  a azul (McGuire, 1992).

No entanto, ainda que com menor expressão, verifica-se a mesma tendência que a observada no gráfico da Figura 20: os mesmos cinco pontos distanciam-se da nuvem de pontos em torno do PF na relação tonalidade/luminosidade, aproximando-se ligeiramente mais do PM3. A distância relativa à luminosidade é maior do que aquela relativa à tonalidade.

Tendo sido identificadas estas diferenças, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) das médias de todas as variáveis para as cinco plantas (314, 339, 411, 436 e 449) e para os progenitores (PF, PM3), para verificar se as diferenças eram significativas ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados no Quadro 9. Verificaram-se diferenças significativas entre os indivíduos e os progenitores para todas as variáveis, exceto no valor de  $a^*$  e de cromaticidade ( $C^*$ ) entre o indivíduo 339 e o PF. No entanto, para os indicadores de luminosidade e tonalidade, este indivíduo exibiu diferenças significativas relativamente ao PF.

**Quadro 9** – Média por planta (n=9) dos valores de luminosidade ( $L^*$ ), escala vermelho-verde ( $a^*$ ), escala amarelo azul ( $b^*$ ), tonalidade ( $h^\circ$ ) e cromaticidade ( $C^*$ ) relativos a cinco indivíduos, ao PF e ao PM3, e distância das coordenadas de cada um ao PF ( $\Delta E_{iPF}^*$ ).

<b>Genótipo</b>	<b><math>L^*</math></b>	<b><math>a^*</math></b>	<b><math>b^*</math></b>	<b><math>h^\circ</math></b>	<b><math>C^*</math></b>	<b><math>\Delta E_{iPF}^*</math></b>					
<b>PM3</b>	61,35	<b><i>a</i>'</b>	3,07	<b><i>d</i></b>	40,83	<b><i>a</i></b>	85,73	<b><i>a</i></b>	40,95	<b><i>e</i></b>	45,73
<b>449</b>	43,57	<b><i>b</i></b>	40,45	<b><i>a</i></b>	28,26	<b><i>bc</i></b>	34,95	<b><i>b</i></b>	49,37	<b><i>ab</i></b>	11,88
<b>314</b>	42,11	<b><i>b</i></b>	40,66	<b><i>a</i></b>	28,83	<b><i>b</i></b>	35,31	<b><i>b</i></b>	49,86	<b><i>a</i></b>	11,33
<b>411</b>	41,69	<b><i>b</i></b>	40,98	<b><i>a</i></b>	29,54	<b><i>b</i></b>	35,69	<b><i>b</i></b>	50,56	<b><i>a</i></b>	11,68
<b>339</b>	41,44	<b><i>b</i></b>	36,55	<b><i>bc</i></b>	25,30	<b><i>c</i></b>	34,63	<b><i>b</i></b>	44,52	<b><i>cd</i></b>	7,39
<b>436</b>	41,28	<b><i>b</i></b>	37,39	<b><i>b</i></b>	27,41	<b><i>bc</i></b>	36,20	<b><i>b</i></b>	46,37	<b><i>bc</i></b>	8,64
<b>PF</b>	35,04	<b><i>c</i></b>	35,28	<b><i>c</i></b>	21,81	<b><i>d</i></b>	31,69	<b><i>c</i></b>	41,49	<b><i>de</i></b>	0,00

<sup>1</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre médias.

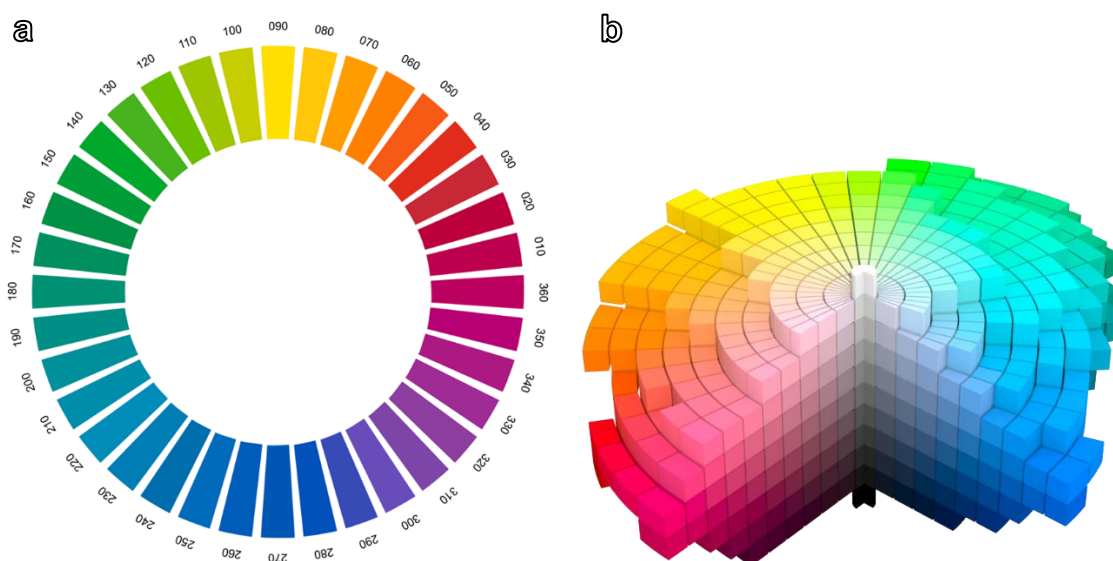
Relativamente ao indicador de tonalidade ( $h^\circ$ ), é possível perceber a partir da Figura 22 que esta se situa perto dos  $30^\circ$  no caso dos frutos do PF, aproximando-se de um vermelho mais vivo, e que os indivíduos analisados exibem frutos com uma tonalidade de vermelho ligeiramente mais alaranjada (entre os  $34,63$  e os  $36,2^\circ$ ). Ambas as tonalidades são aceitáveis para os objetivos definidos no melhoramento para esta característica. Apesar de os descendentes não apresentarem diferenças significativas entre si para esta variável, o indivíduo 436 é aquele que apresenta uma tonalidade mais diferenciada da do PF, com um valor de  $36,2^\circ$ .

Dentro destas tonalidades observadas, os indicadores de luminosidade ( $L^*$ ) e de cromaticidade ( $C^*$ ) serão mais críticos na aproximação ou não aos objetivos estabelecidos.

Relativamente ao indicador de luminosidade, o indivíduo mais promissor face ao objetivo seria o 449, aquele que apresenta o maior valor entre os cinco indivíduos ( $43,57$ ), bastante distinto do valor do PF, apesar de, mais uma vez, este valor não ser significativamente diferente relativamente ao de nenhum dos outros descendentes. Os valores destes situam-se todos muito próximo do centro da escala de luminosidade, que assume valores de 0 (mais escuro) a 100 (mais claro). Ou seja, o indivíduo 449 é aquele que apresenta a coloração mais clara.

No que diz respeito à cromaticidade, este é o indicador que apresenta maior variabilidade entre os indivíduos analisados, em termos de diferenças entre médias. Maiores valores de cromaticidade indicam cores mais saturadas, ou seja, mais afastadas do eixo central de luminosidade (Figura 22). Os valores mais próximos do eixo, por sua vez, apresentam cores menos saturadas. Os indivíduos com um valor de cromaticidade significativamente mais elevado, quer relativamente aos outros descendentes, quer relativamente a ambos os progenitores, são o 411 ( $50,56$ ) e o 314 ( $49,86$ ). O indivíduo 449 apresenta o terceiro valor mais alto ( $49,37$ ), não sendo significativamente diferente daqueles nem do 436 ( $46,37$ ). Uma vez que o indivíduo 449 é também aquele que apresenta o valor mais elevado de

luminosidade, bem como a maior distância às coordenadas de cor do PF ( $\Delta E_{iPF}^*=11,88$ ) faz com que seja o mais promissor comparativamente aos restantes descendentes.



**Figura 22** – Relação entre a tonalidade visualmente percebida e o respetivo valor do ângulo de tonalidade ( $h^\circ$ ) (a, Fonte: [graphicdesign.stackexchange.com](http://graphicdesign.stackexchange.com)); representação do espaço tridimensional formado pela luminosidade (eixo vertical central), cromaticidade (afastamento horizontal ao eixo central de luminosidade) e tonalidade (valor do ângulo em cada plano horizontal) (b, Fonte: [www.pngwing.com](http://www.pngwing.com)).

Assim, é possível afirmar que foi possível obter indivíduos que produzam frutos com a coloração desejada, através do cruzamento realizado.

Não foi, no entanto, possível observar indivíduos que produzissem frutos de tonalidade amarela, semelhante à do PM3. De acordo com o exposto na secção 2.2.2.3, relativamente aos genes maiores propostos por vários autores como reguladores da expressão da cor em frutos de framboesa (Crane & Lawrence, 1931; Jennings & Carmichael, 1975, 1980; Keep, 1984), talvez a explicação mais plausível seja a da interferência do gene *Ys*. Jennings & Carmichael (1975) postulam que da espécie *R. phoeniculus* derive um gene, *Ys*, que inibe a ação do gene *Y* (que inibe a síntese de antocianinas, conferindo coloração amarela aos frutos), permitindo a síntese de antocianinas que conferem a cor vermelha aos frutos. Se o PF fosse homocigótico dominante para este gene (*YsYs*), assumindo que o PM3 teria de ser homocigótico recessivo (*ysys*) para exibir frutos de coloração amarela, a descendência seria toda heterocigótica para este *locus*, não sendo capaz de exibir frutos de coloração amarela, apenas vermelha.

No entanto, tal como salientado, mais uma vez, na secção 2.2.2.3, a expressão da cor do fruto é um fenómeno de alguma complexidade. Trabalhos recentes têm-se focado no estudo da contribuição de cada um dos progenitores para a transmissão de algumas características à descendência, que pode não ser equivalente (Fan et al., 2014; Gimenez et al., 2021; Laviola

et al., 2018; Naves et al., 2022). Esta diferença na contribuição de cada progenitor para a expressão fenotípica da descendência denomina-se *parent-of-origin effects* (POEs, efeitos do progenitor de origem), podendo manifestar-se através da transmissão de um carácter específico oriundo do genótipo de um progenitor com uma posição específica no cruzamento: materna ou paterna (García-Aguilar & Gillmor, 2015; Hager et al., 2008; Hu et al., 2016; Laurin et al., 2018). Tal resulta em diferenças entre a expressão fenotípica de híbridos recíprocos<sup>11</sup>, que podem dever-se a diversos fenómenos, tais como efeitos maternos<sup>12</sup> (Santure & Spencer, 2006; Wolf & Wade, 2016), transmissão de genoma citoplasmático (distribuição assimétrica de mitocôndrias e plastídios durante a microgametogénese ou a fertilização) (Nagata, 2010; Rajcan et al., 2002), ou *imprinting* genómico<sup>13</sup> (Köhler et al., 2012; Rodrigues & Zilberman, 2015; Satyaki & Gehring, 2017). Quando estas diferenças são observadas diz-se que há efeitos recíprocos (Gimenez et al., 2021). Gimenez et al. (2021) estudaram o efeito de cruzamentos recíprocos em vários parâmetros avaliados, no tomate, e detetaram efeitos recíprocos em 13 dos 16 parâmetros analisados, de entre os quais para os valores de  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$ , num dos cruzamentos, e para o índice de cor  $a^*/b^*$  noutro dos cruzamentos. Os autores concluíram também que quanto menor a distância genética entre os progenitores, maior a incidência de efeitos recíprocos. Laviola et al. (2018) identificaram efeitos maternos na transmissão de todos os parâmetros medidos da espécie arbórea *Jatropha curcas*; e Naves et al. (2022) verificaram efeitos recíprocos na maioria das características agronómicas e de qualidade do fruto em híbridos de pimento. Para a cultura da framboesa não existem estudos publicados relativamente a estes mecanismos, não se sabendo se as características de cor do fruto evidenciam algum efeito recíproco ou POEs, podendo esta, no entanto, ser uma possibilidade.

No que diz respeito às diferentes variações de cromaticidade e luminosidade para a mesma cor do fruto, como se verificou nos indivíduos analisados, estas estão mais relacionadas com a regulação bioquímica e são o resultado da combinação entre o tipo e concentração de antocianinas presente – maioritariamente cianidinas e pelargonidinas -, e o ambiente celular em que se encontram (Hall et al., 2009; Jennings, 1988; Wang et al., 2009).

Em 2009, Kassim et al. mapearam QTLs de 8 tipos de antocianinas (das quais quatro são cianidinas e quatro são pelargonidinas) na mesma região de um cromossoma (LG1) e 7 delas noutra região do mesmo cromossoma (LG4). Este estudo foi realizado na população resultante do cruzamento entre a cv. Latham (exibe frutos descritos como vermelho-escuro) e a cv. Glen Moy (exibe frutos descritos como vermelho-pálido). Os autores identificam ainda

---

<sup>11</sup> Híbridos descendentes dos mesmos progenitores, cujos cruzamentos foram realizados em direções opostas (Gimenez et al., 2021).

<sup>12</sup> Ocorrem quando os genes expressos no genoma da mãe afetam o fenótipo da descendência (Wolf & Wade, 2016).

<sup>13</sup> A expressão diferencial de um gene autossómico, dependente do seu progenitor de origem (Köhler et al., 2012).

outros genes que codificam fatores de transcrição para a biossíntese de flavonoides (bHLH e FRUITE4), associados a cada uma das regiões identificadas para os 8 tipos de antocianinas, que propõem influenciar a concentração de cada um.

Na sequência deste trabalho, McCallum et al. (2010) estudaram a transmissão da cor na mesma população, através da comparação entre dois locais, duas modalidades de produção (ao ar livre e em estufa), ao longo de três anos. Os autores identificaram genes estruturais maiores e os fatores de transcrição mencionados por Kassim et al (2009) que influenciam a biossíntese de flavonoides. Estes fatores de transcrição afetam a concentração de diferentes tipos de cianidina: O alelo *b* do gene bHLH (próximo do LG1) está associado a concentrações mais baixas de C3S e C3G mas mais elevadas de C3GR e C3R. O alelo *b* do gene FRUITE4 (próximo do LG4) está associado a maiores concentrações de CAS e C3R mas concentrações mais baixas de C3GR e C3G. As cvs. Latham e Glen Moy são, respectivamente, heterozigóticas (*ab*) e homozigóticas (*aa*) para ambos os *loci*.

Os autores observam que a cor do fruto em framboesa vermelha se deve principalmente às cianidinas, em detrimento das pelargonidinas; os flavonoides desempenham uma importante função na coloração dos frutos, atuando como co-pigmentos, possivelmente desempenhando uma função de proteção contra radiação UV; observaram variação de cor entre estações, devido essencialmente à alteração da proporção da concentração das diferentes cianidinas nos frutos, que os autores atribuem à quantidade de horas de luz recebidas; a heritabilidade das variáveis de cor foi elevada ao longo dos três anos em estudo, como reportado por outros autores para a concentração de antocianinas, capacidade antioxidante e conteúdo total de compostos fenólicos em framboesa e uva (Connor et al., 2005a; Connor et al., 2005b; Liang et al., 2009), o que se mostra promissor para a introdução desta característica em programas de melhoramento.

## 5. Conclusões e perspectivas

O trabalho realizado no âmbito desta dissertação teve como objetivo avaliar as descendências obtidas através de três cruzamentos que partilham o mesmo progenitor feminino. Cada família foi avaliada com o propósito de apoiar a seleção através da avaliação da expressão de uma característica específica, numa fase inicial do programa de melhoramento de framboesa a decorrer no PIF: resistência à doença da ferrugem tardia (Fam1), precocidade da produção (Fam2) e coloração dos frutos mais clara do que aquela dos do progenitor feminino (Fam3).

Na Fam1 foram avaliadas 773 plantas em estufa, das quais foram selecionadas 78, com uma severidade máxima de 5% e baixo nível de infeção na totalidade da planta. Verificou-se que a expressão da severidade da doença nas plantas terá sido mais afetada pela temperatura do ar registada durante o período de desenvolvimento do fungo, após inoculação. A amplitude de valores foi máxima nas plantas inoculadas a 04 de maio de 2022 e mínima nas plantas inoculadas a 17 de maio de 2022. A avaliação de campo realizada posteriormente, no final de outubro, registou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para as médias de severidade das três famílias e de ambos os progenitores. Estes resultados indicam que terá sido introduzida alguma resistência na descendência, que aparenta ser controlada de forma quantitativa. No entanto, a realização deste ensaio beneficiaria de algumas melhorias, nomeadamente:

- Idealmente, as plantas devem ser inoculadas todas ao mesmo tempo, para que seja eliminado o erro introduzido pela variabilidade ambiental entre datas. Tal não sendo possível ou praticável, como foi o caso, estas devem ser inoculadas em datas mais próximas umas das outras, em alturas em que se estime que a temperatura varie entre os 20 e os 25 °C. Em alternativa, as plantas devem ser mantidas em estufa com ambiente controlado, se tais infraestruturas estiverem disponíveis, para permitir a máxima expressão dos sinais e sintomas da doença;
- O progenitor utilizado para a introdução de resistência deve ser melhor avaliado, na tentativa de, na medida do possível, tentar aferir o tipo de resistência que se vai tentar introduzir. Indicadores como o tipo de resposta dos tecidos ao contacto com o fungo, a velocidade do desenvolvimento da doença e o tamanho médio das pústulas seriam úteis;
- A avaliação de campo deve ser realizada numa altura em que as condições ambientais sejam mais propícias à máxima expressão da doença, para que se potencie máxima representatividade dos resultados.

Na sequência destas recomendações, é importante ressaltar que ainda muitos processos fisiológicos carecem de estudos mais elucidativos e conclusivos, nomeadamente nos mecanismos de resistência à doença da ferrugem tardia em framboesa vermelha.

Na Fam2 foram avaliadas 1827 plantas, das quais 242 (13,2%) demoraram menos tempo e requereram menos GDC (TB5°C) que o PF desde a plantação até à colheita do *king fruit*, em 2022. Estes 242 genótipos foram agrupados em 12 grupos de precocidade: o mais precoce demorou 13 semanas e precisou de 1359,8 GDC (TB5°C) comparativamente aos 2044,3 GDC (TB5°C) e 18,3 semanas necessários para o progenitor feminino. Os indicadores biométricos medidos apresentaram valores bastante variáveis entre grupos e dentro do mesmo grupo de precocidade. O número de laterais produtivos em relação ao comprimento total é relativamente mais reduzido do que aquele reportado na bibliografia para variedades que apresentam rendimentos satisfatórios (Sønsteby & Heide, 2010). Na bibliografia (Danek, 1999), as componentes de precocidade são reportadas como aditivas, pelo que é relativamente fácil introduzir esta característica em programas de melhoramento.

Na Fam3 foram avaliados os frutos de 95 (20,5%) plantas de um total de 464, bem como os frutos dos progenitores. No geral, a descendência exibiu valores para as variáveis medidas e avaliadas ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ ,  $\Delta E_{ab}^*$ ) bastante próximos dos do progenitor feminino, à exceção de 5 indivíduos. Estes exibiram valores médios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos do progenitor feminino, nomeadamente: maiores valores de luminosidade ( $L^*$ ), entre 41,28 e 43,57 ( $L^*_{PF}=35,04$ ); maior cromaticidade ( $C^*$ ) da cor, entre 44,52 e 50,56 ( $C^*_{PF}=41,49$ ); e tonalidades de vermelho ( $h^\circ$ ) ligeiramente mais alaranjadas, entre 34,63 e 36,2° ( $h^\circ_{PF}=31,69$ ). O indivíduo mais promissor aparenta ser o 449, que apresenta o maior valor de luminosidade ( $L^*_{449}=43,57$ ) e o terceiro maior valor de saturação ( $C^*_{PF}=49,37$ ).

Os mecanismos de transmissão da cor e a sua regulação genética carecem de estudos mais recentes e conclusivos na cultura da framboesa, para que essa informação possa ser incorporada em programas de melhoramento, com a seleção de progenitores mais aptos para a introdução das características de cor do fruto mais apelativas para os diferentes mercados a que se destinam.

Na sequência destas avaliações e seleções, os próximos passos passam por avaliar se o nível de expressão das três características em estudo é satisfatório nos indivíduos com potencial para seleção, em relação aos objetivos estabelecidos. Caso não seja, é necessário realizar retrocruzamentos entre os indivíduos com potencial de seleção e os respetivos progenitores masculinos, ou com novos progenitores masculinos. Caso o nível de expressão seja satisfatório, é preciso avaliar outros parâmetros como o rendimento e a qualidade dos frutos e aferir se se põe a necessidade de realizar retrocruzamentos com o progenitor feminino, até ser atingido o melhor compromisso entre a característica que se pretende introduzir (resistência à doença da ferrugem tardia, precocidade e cor do fruto) e as características de qualidade do progenitor feminino. O objetivo último deste programa é obter um genótipo com a qualidade do fruto e rendimento do progenitor feminino, exibindo simultaneamente maior resistência à doença da ferrugem tardia, maior precocidade na produção e frutos de coloração mais clara.

## 6. Referências

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5<sup>a</sup> ed.). Elsevier Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2009-0-02037-6>
- Aime, M. C., & McTaggart, A. R. (2021). A higher-rank classification for rust fungi, with notes on genera. *Fungal Systematics and Evolution*, 7(1), 21–47.  
<https://doi.org/10.3114/fuse.2021.07.02>
- Aktar-Uz-Zaman, M., Tuhina-Khatun, M., Hanafi, M. M., & Sahebi, M. (2017). Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivars: an overview. Em *Biotechnology and Biotechnological Equipment* (Vol. 31, Número 3, pp. 431–445). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1304180>
- Allard, R. (1999). *Principles of plant breeding* (2<sup>a</sup> ed.). Wiley.
- Alves, R. F., Junior, N. S. M., & Spósito, M. B. (2018). Preservation of the urediniospores of *Phakopsora euvitis*, the causal agent of grape leaf rust. *European Journal of Plant Pathology*, 150(4), 1103–1106. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1340-4>
- Anthony, V. M., Williamson, B., Jennings, D., & Shattock, R. C. (1986). Inheritance of resistance to yellow rust (*Phragmidium rubi-idaei*) in red raspberry. *Annals of Applied Biology*, 109, 365–314.
- Bariana, H. S. (2003). Breeding for disease resistance. Em B. Thomas, D. J. Murphy, & B. G. Murray (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (1<sup>a</sup>, Vol. 1, pp. 244–252). Elsevier Academic Press.
- Bender, C. M., Prins, R., & Pretorius, Z. A. (2016). Development of a Greenhouse Screening Method for Adult Plant Response in Wheat to Stem Rust. *Plant Disease*, 100(8), 1627–1633.
- Birch, A. N. E., Jones, A. T., Fenton, B., Malloch, G., Geoghegan, I., Gordon, S. C., Hillier, J., & Begg, G. (2002). Resistance-breaking raspberry aphid biotypes: constraints to sustainable control through plant breeding. *Acta Horticulturae*, 585, 315–317.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.585.51>
- Black, B., Frisby, J., Lewers, K., Takeda, F., & Finn, C. (2008). Heat unit model for predicting bloom dates in *Rubus*. *HortScience*, 43(7), 2000–2004.  
<https://doi.org/10.21273/hortsci.43.7.2000>
- Brown, J., Caligari, P., & Campos, H. (2014). Plant Breeding. Em *Plant Breeding* (2<sup>a</sup> ed.). John Wiley & Sons Ltd.
- Caligari, P. D. S., & Brown, J. (2003). Plant Breeding, Practice. Em B. Thomas, D. J. Murphy, & B. G. Murray (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (1<sup>a</sup> ed, Vol. 1, pp. 112–118). Elsevier Academic Press.

- Capela, A. S. (2020). *Influência das condições de viveiro na produtividade da framboesa no sistema de produção em lançamento de segundo ano da variedade Kwanza* [Dissertação de mestrado]. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Carew, J., Gillespie, T., White, J., Wainwright, H., Brennan, R., & Battey, N. (2000a). The control of the annual growth cycle in raspberry. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(5), 495–503.
- Carew, J., Hadley, P., Darby, J., & Battey, N. (2000b). The effect of temperature on the vegetative growth and reproductive development of the primocane fruiting raspberry cv. Autumn Bliss. *Acta Horticulturae*, 505, 185–190.
- Carew, J., Mahmood, K., Darby, J., Hadley, P., & Battey, N. (2003). The Effect of Temperature, Photosynthetic Photon Flux Density, and Photoperiod on the Vegetative Growth and Flowering of 'Autumn Bliss' Raspberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(3), 291–296.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113(4), 859–871.
- Clark, J. R., Stafne, E. T., Hall, H. K., & Finn, C. E. (2007). Blackberry breeding and genetics. *Plant Breeding Reviews*, 29, 1–19.
- Connor, A. M., McGhie, T. K., Stephens, M. J., Hall, H. K., & Alspach, P. A. (2005a). Variation and Heritability Estimates of Anthocyanins and Their Relationship to Antioxidant Activity in a Red Raspberry Factorial Mating Design. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(4), 534–542. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.4.534>
- Connor, A. M., Stephens, M. J., Hall, H. K., & Alspach, P. A. (2005b). Variation and Heritabilities of Antioxidant Activity and Total Phenolic Content Estimated from a Red Raspberry Factorial Experiment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(3), 403–411. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.3.403>
- Crane, M. B., & Lawrence, C. J. W. (1931). Inheritance of sex, colour, and hairiness in the raspberry, *Rubus idaeus* L. *Journal of Genetics*, 24, 243–255.
- Danek, J. (1999). Combining ability for earliness of primocane-fruiting for some raspberry genotypes in polish conditions. *Acta Horticulturae*, 505, 343–349.
- Danek, J. (2002). 'Polka' and 'Procusa' – New primocane fruiting raspberry cultivars from Poland. *Acta Horticulturae*, 585, 197–198.
- Darnell, R. L., Cantliffe, D. J., Kirschbaum, D. S., & Chandler, C. K. (2002). The physiology of flowering in strawberry. Em J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews* (Vol. 28, pp. 325–349). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470650851.ch6>
- Darrow, G. M. (1937). Blackberry and raspberry improvement. Em *USDA Yearbook of Agriculture* (pp. 469–533). Government Printing Office.

- Daubeny, H. A. (1966). Inheritance of immunity in the red raspberry to the North American strain of the aphid *Amphorophora rubi* Kltb. *Proceedings American Society Horticultural Science*, 88, 346–351.
- Daubeny, H. A. (1987). A hypothesis for inheritance of resistance to cane *Botrytis* in red raspberry. *HortScience*, 22, 116–119.
- Daubeny, H. A. (1997). *Raspberry* (3.<sup>a</sup> ed.). ASHS Press.
- Daubeny, H. A., & Stary, D. (1982). Identification of resistance to *Amphorophora agathonica* in the native North American red raspberry. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 107, 593–597.
- Díaz-Lago, J. E., Stuthman, D. D., & Leonard, K. J. (2003). Evaluation of Components of Partial Resistance to Oat Crown Rust Using Digital Image Analysis. *Plant Disease*, 87(6), 667–674.
- Edin, P., Gaillard, P., & Massardier, P. (1999). *Le Framboisier*. CTFIL.
- Ellis, M. A., Converse, R. H., Williams, R. N., & Williamson, B. (1991). *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Insects*. American Phytopathological Society.
- Fan, X. M., Zhang, Y. D., Yao, W. H., Bi, Y. Q., Liu, L., Chen, H. M., & Kang, M. S. (2014). Reciprocal Diallel Crosses Impact Combining Ability, Variance Estimation, and Heterotic Group Classification. *Crop Science*, 54(1), 89–97. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.06.0393>
- FAO. (2022). *FAOSTAT statistical database*. [Rome]: FAO, c1997. <https://search.library.wisc.edu/catalog/999890171702121>
- Fejer, S. O. (1977). Inheritance of yield, yield components, and fall-fruiting habit in red raspberry diallel crosses. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 19, 1–13.
- Field Crop Diseases Victoria. (2022). *Disease Ratings: Overview*. Identification & Management of Field Crop Diseases in Victoria.
- Finn, C. E., Moore, P. P., & Kempler, C. (2008). Raspberry Cultivars: What's New? What's Succeeding? Where are Breeding Programs Headed? *Proceedings IX International Rubus and Ribes Symposium*, 777(1), 33–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.777.1>
- Finn, C. E., & Strik, B. C. (2015). Blackberry production in the Pacific northwestern US: a long history and a bright future. *XI International Rubus and Ribes Symposium* 1133, 35–44.
- Flor, H. H. (1942). Inheritance of pathogenecity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, 32, 653–669.
- Funt, R. C. (2013). Growth and development. Em R. C. Funt & H. K. Hall (Eds.), *Raspberries* (1<sup>a</sup> ed, pp. 21–31). CABI.

- Furtado, G. Q., Alves, S. A. M., Czermainski, A. B. C., & Massola, N. S. (2007). Preservation of *Phakopsora pachyrhizi* Uredospores. *Journal of Phytopathology*, 156(1), 62–64. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01313.x>
- Gambardella, M., Bañados, P., Sánchez, S., Grez, J., Contreras, E., & Sagredo, B. (2016). New raspberry cultivars for Chile: First releases from the local breeding program. *Acta Horticulturae*, 1117, 19–23. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1117.4>
- García-Aguilar, M., & Gillmor, C. S. (2015). Zygotic genome activation and imprinting: parent-of-origin gene regulation in plant embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.020>
- Gimenez, M. D., Vazquez, D. V., Trepát, F., Cambiaso, V., & Rodríguez, G. R. (2021). Fruit quality and DNA methylation are affected by parental order in reciprocal crosses of tomato. *Plant Cell Reports*, 40(1), 171–186. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02624-x>
- GPP. (2019). *Estratégias para a internacionalização do setor agroalimentar: Framboesa*. GlobalAgriMar.
- GPP. (2022). *Informação sobre produtos: Framboesa*. Ministério da Agricultura.
- Graham, J., & Brennan, R. (2018). Introduction to the Rubus Genus. Em J. Graham & R. Brennan (Eds.), *Raspberry: Breeding, Challenges and Advances* (1.<sup>a</sup> ed., p. 164). Springer, Cham. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-99031-6>
- Graham, J., Hackett, C. A., Smith, K., Karley, A. J., Mitchell, C., Roberts, H., & O'Neill, T. (2014). Genetic and environmental regulation of plant architectural traits and opportunities for pest control in raspberry. *Annals of Applied Biology*, 165(3), 318–328.
- Graham, J., Hackett, C. A., Smith, K., Woodhead, M., Hein, I., & McCallum, S. (2009). Mapping QTLs for developmental traits in raspberry from bud break to ripe fruit. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(6), 1143–1155. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-0969-6>
- Graham, J., & Jennings, S. (2009). Raspberry Breeding. Em S. M. Jain & P. M. Priyadarshan (Eds.), *Breeding plantation tree crops: Temperate species* (Vol. 84). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-71203-1>
- Graham, J., & McNicol, R. J. (1995). An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between Rubus species. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(7–8), 1128–1132.
- Graham, J., Smith, K., Tierney, I., Mackenzie, K., & Hackett, C. A. (2006). Mapping gene H controlling cane pubescence in raspberry and its association with resistance to cane *botrytis* and spur blight, rust and cane spot. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 818–831. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00122-005-0184-z>

- Hager, R., Cheverud, J. M., & Wolf, J. B. (2008). Maternal Effects as the Cause of Parent-of-Origin Effects That Mimic Genomic Imprinting. *Genetics*, *178*(3), 1755–1762. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.080697>
- Halevy, A. H. (1986). *Handbook of flowering: Volume V* (A. H. Halevy, Ed.). CRC Press: Taylor & Francis Group.
- Hall, H. K., Hummer, K. E., Jamieson, A. R., Jennings, S., & Weber, C. A. (2009). Raspberry breeding and genetics. *Plant Breeding Reviews*, *32*, 39–353. <https://doi.org/10.1002/9780470593806.ch2>
- Harlan, H. V., & Pope, M. N. (1922). The use and value of back-crosses in small-grain breeding. *Journal of Heredity*, *13*(7), 319–322.
- Hartman, G. L., Miles, M. R., & Frederick, R. D. (2005). Breeding for resistance to soybean rust. *Plant Disease*, *89*(6), 664–666. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0664>
- Harvey, K. H., & Sobey, T. (2013). Site Selection. Em R. C. Funt & H. K. Hall (Eds.), *Raspberries* (p. 300). CABI.
- Hasan, M. M., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Mahmood, M., Rahim, H. A., Alam, M. A., Ashkani, S., Malek, M. A., & Latif, M. A. (2015). Marker-assisted backcrossing: A useful method for rice improvement. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *29*(2), 237–254. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.995920>
- Hedrick, U. P. (1925). The small fruits of New York. Em *New York State Agr. Expt. Sta.* (Vol. 33).
- Heide, O. M., & Sønsteby, A. (2011). Physiology of flowering and dormancy regulation in annual and biennial-fruited red raspberry (*Rubus idaeus* L.) - A review. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *86*(5), 433–442. <https://doi.org/10.1080/14620316.2011.11512785>
- Hoover, E., Luby, J., Bedford, D., Pritts, M. P., Hanson, E., Dale, A., & Daubeny, H. A. (1989). Temperature influence on harvest date and cane development of primocane-fruited raspberries. *Acta Horticulturae*, *262*, 297–303.
- Hospital, F. (2005). Selection in backcross programmes. *Philosophical Trans Royal Soc B*, *360*, 1503–1511.
- Hu, Y., Rosa, G. J. M., & Gianola, D. (2016). Incorporating parent-of-origin effects in whole-genome prediction of complex traits. *Genetics Selection Evolution*, *48*(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0213-1>
- Hudson, J. P. (1954). Propagation of Plants by Root Cuttings: I. Regeneration of Raspberry Root Cuttings. *Journal of Horticultural Science*, *29*(1), 27–43.
- 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.
- IPMA, I. P. (2022a). *Acompanhamento do Clima*. <https://www.ipma.pt/>
- IPMA, I. P. (2022b). *Normais Climatológicas*. <https://www.ipma.pt/>

- Jamieson, A. R., & Nickerson, N. L. (1999). Inheritance of resistance to late yellow rust (*Pucciniastrum americanum*) in red raspberry. *Acta Horticulturae*, 505, 53–58. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.505.5>
- Jennings, D. (1982). Further evidence on the effects of gene H, which confers cane hairiness, on resistance to raspberry diseases. *Euphytica*, 31, 953–956.
- Jennings, D. (1983). Inheritance of resistance to *Botrytis cinerea* and *Didymella applanata* in canes of *Rubus idaeus*, and relationships between these resistances. *Euphytica*, 32, 895–901.
- Jennings, D. (1988). *Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth*. Academic Press.
- Jennings, D. (2002). Breeding Primocane-Fruiting Raspberries at Medway Fruits-Progress and Prospects. *Acta Horticulturae*, 585, 85–89. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.585.10>
- Jennings, D., & Carmichael, E. (1975). A dominant gene for yellow fruit in the raspberry. *Euphytica*, 24, 467–470.
- Jennings, D., & Carmichael, E. (1980). Anthocyanin Variation in the genus *Rubus*. *The New Phytologist*, 84(3), 505–513.
- Jennings, D., & Mcgregor, G. R. (1988). Resistance to cane spot (*Elsinoe veneta*) in the red raspberry and its relationship to resistance to yellow rust (*Phragmidium rubi-idaei*). *Euphytica*, 37, 3–180.
- Jennings, S. (2018). Advances in *Rubus* Breeding. Em J. Graham & R. Brennan (Eds.), *Raspberry: Breeding, Challenges and Advances* (1.<sup>a</sup> ed., p. 164). Springer, Cham. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-99031-6>
- Jennings, S., Graham, J., Ferguson, L., & Young, V. (2016). New developments in raspberry breeding in Scotland. *Acta Horticulturae*, 1133, 23–28. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1133.4>
- Jones, A. T., & McGavin, W. J. (1998). Infectibility and sensitivity of UK raspberry, blackberry and hybrid berry cultivars to *Rubus* viruses. *Annals of Applied Biology*, 132(2), 239–251.
- Jones, A. T., McGavin, W. J., & Birch, A. N. E. (2002). Effectiveness of resistance genes to the large raspberry aphid, *Amphorophora idaei* Börner, in different raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes and under different environmental conditions. *Annals of Applied Biology*, 136, 147–152.
- Karley, A. J., Mitchell, C., Brookes, C., McNicol, J., O'neill, T., Roberts, H., Graham, J., & Johnson, S. N. (2016). Exploiting physical defence traits for crop protection: leaf trichomes of *Rubus idaeus* have deterrent effects on spider mites but not aphids. *Annals of Applied Biology*, 168(2), 159–172.

- Karunakar, R. I., Pande, S., & Thakur, R. P. (1996). A greenhouse screening technique to assess rust resistance in sorghum. *International Journal of Pest Management*, 42(4), 221–225.
- Kassim, A., Poette, J., Paterson, A., Zait, D., McCallum, S., Woodhead, M., Smith, K., Hackett, C., & Graham, J. (2009). Environmental and seasonal influences on red raspberry anthocyanin antioxidant contents and identification of quantitative traits loci (QTL). *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(5), 625–634. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800174>
- Keep, E. (1961). Autumn-Fruiting in Raspberries. *Journal of Horticultural Science*, 36(3), 174–185. <https://doi.org/10.1080/00221589.1961.11514013>
- Keep, E. (1968). Inheritance of resistance to powdery mildew, *Sphaerotheca macularis* (Fr.) Jaczewski in the red raspberry, *Rubus idaeus* L. *Euphytica*, 17, 417–438.
- Keep, E. (1984). Inheritance of fruit colour in a wild russian red raspberry seedling. *Euphytica*, 33, 507–515.
- Keep, E. (1988). Primocane (autumn)-fruiting raspberries: a review with particular reference to progress in breeding. *Journal of Horticultural Science*, 63(1), 1–18. <https://doi.org/10.1080/14620316.1988.11515821>
- Keep, E., Knight, V. H., & Parker, J. H. (1977). *Rubus coreanus* as donor of resistance to cane diseases and mildew in red raspberry breeding. *Euphytica*, 26(2), 505–510.
- Kershaw, C. (1991). *The effect of temperature on the rate of shoot development in the raspberry (Rubus idaeus L.) cultivar Autumn Bliss* [Dissertação de Douturamento]. Wye College, Univ. London.
- Knight, V. H. (1991). Use of the salmonberry, *Rubus spectabilis* Pursh., in red raspberry breeding. *Journal of Horticultural Science*, 66(5), 575–581. <https://doi.org/10.1080/00221589.1991.11516186>
- Knight, V. H., & Fernández, F. F. (2008). New summer fruiting red raspberry cultivars from East Malling Research. *Acta Horticulturae*, 777, 173–176. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.777.24>
- Köhler, C., Wolff, P., & Spillane, C. (2012). Epigenetic Mechanisms Underlying Genomic Imprinting in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 331–352. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105514>
- Langridge, P., Barr, A. R., & Chalmers, K. J. (2003). Marker Assisted Selection. Em B. Thomas, D. J. Murphy, & B. G. Murray (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (1st ed., Vol. 1, pp. 146–158). Elsevier Academic Press.
- Laurin, C., Cuellar-Partida, G., Hemani, G., Smith, G. D., Yang, J., & Evans, D. M. (2018). Partitioning Phenotypic Variance Due to Parent-of-Origin Effects Using Genomic Relatedness Matrices. *Behavior Genetics*, 48(1), 67–79. <https://doi.org/10.1007/s10519-017-9880-0>

- Laviola, B. G., Teodoro, P. E., Peixoto, L. D. A., & Bhering, L. L. (2018). Parental selection in diallel crosses of *Jatropha curcas* using mixed models. *Acta Scientiarum. Agronomy*, *40*(1), 1–7. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.35008>
- Lawrence, F. J. (1976). Breeding self-supporting fall cropping red raspberries. *Acta Horticulturae*, *60*, 145–150.
- Liang, Z., Yang, C., Yang, J., Wu, B., Wang, L., Cheng, J., & Li, S. (2009). Inheritance of anthocyanins in berries of *Vitis vinifera* grapes. *Euphytica*, *167*(1), 113–125. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9868-1>
- Lockshin, L. S. and D. C. E., & D.C. Elfving. (1981). Flowering response of 'Heritage' red raspberry to temperature and nitrogen. *Hortscience*, *16*, 527–528.
- Luffman, M., & Buszard, D. (1989). Susceptibility of primocanes of six red raspberry cultivars to late yellow rust (*Pucciniastrum americanum* (Farl.) Arth.). *Canadian Plant Disease Survey*, *69*(2), 117–119.
- Ly, B., Dyer, E., Feig, J., Chien, A., & Bino, S. (2020). Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. *The Journal of investigative dermatology*, *140*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.11.003>.
- McCallum, S., Woodhead, M., Hackett, C. A., Kassim, A., Paterson, A., & Graham, J. (2010). Genetic and environmental effects influencing fruit colour and QTL analysis in raspberry. *Theoretical and Applied Genetics*, *121*(4), 611–627. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1334-5>
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, *27*(12), 1254–1255.
- McIntosh, R. A., Devos, K. M., Dubcovsky, Y. J., & et al. (2008). Catalogue of gene symbols for wheat: 2008 supplement. *Annual Wheat Newsletter*, *54*, 209–225.
- Meng, R., & Finn, C. (2002). Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry. *Journal of the American society for Horticultural Science*, *127*(5), 767–775.
- Misic, P. D. (1970). An account to the investigation of inheritance in raspberry. *Jugoslovensko Vocarstvo*, *4*, 80–89.
- Mladin, P., & Mladin, G. (2008). Improvement of Raspberry Cultivars in Romania. *Acta Horticulturae*, *777*, 115–120. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.777.14>
- Moore, P. P. (2004). 'Cascade Delight' red raspberry. *HortScience*, *39*(1), 185–187.
- Moore, P. P. (2006). 'Cascade Dawn' red raspberry. *HortScience*, *41*(3), 857–859.
- Moore, P. P. (2008). *Rubus* spp. – red and black raspberry. Em J. Janick & R. E. Paull (Eds.), *The encyclopedia of fruit and nuts* (pp. 226–238). CABI.
- Moore, P. P., & Finn, C. E. (2007). 'Cascade Bounty' red raspberry. *HortScience*, *42*(2), 393–396.

- Nagata, N. (2010). Mechanisms for independent cytoplasmic inheritance of mitochondria and plastids in angiosperms. *Journal of Plant Research*, 123(2), 193–199. <https://doi.org/10.1007/s10265-009-0293-x>
- Naves, E. R., Scossa, F., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., & Zsögön, A. (2022). Heterosis and reciprocal effects for agronomic and fruit traits in Capsicum pepper hybrids. *Scientia Horticulturae*, 295(118021), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110821>
- Nelson, R. R. (1978). Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 16, 359–378.
- Oliveira, P. B. (2021). Manual de Boas Práticas de Fruticultura: Framboesa. *FL&F*, 7.
- Oliveira, P. B., Oliveira, C. M., & Monteiro, A. A. (2004). Pruning Date and Cane Density Affect Primocane Development and Yield of ‘Autumn Bliss’ Red Raspberry. *HortScience*, 39(3), 520–524.
- Oliveira, P. B., Valdivieso, T., Esteves, A., Mota, M., & Fonseca, L. L. (2007). A planta de framboesa: morfologia e fisiologia. *Divulgação Agro*, 556(1).
- Ourecky, D. (1975). Brambles. Em J. Janick & J. N. Moore (Eds.), *Advances in Fruit Breeding* (pp. 98–129). Purdue Univ. Press.
- Ourecky, D. (1976). Fall bearing red raspberries, their future and potencial. *Acta Horticulturae*, 60, 135–144.
- Ourecky, D. (1978). The small fruit breeding programme in New York State. *Fruit Varieties Journal*, 32(3), 50–57.
- Peel, M. C., Finlayson, B. L., & McMahon, T. A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11(5), 1633–1644.
- R Core Team. (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. (4.2.2). R Foundation for Statistical Computing.
- Rajcan, I., Kasha, K. J., Kott, L. S., & Beversdorf, W. D. (2002). Evaluation of cytoplasmic effects on agronomic and seed quality traits in two doubled haploid populations of *Brassica napus* L. *Euphytica*, 123(3), 401–409. <https://doi.org/10.1023/A:1015057923578>
- Rasband, W. S. (2022). *ImageJ* (1.53). U. S. National Institutes of Health.
- Ribeiro, R. R. (2021). *Intensidade da ferrugem tardia em framboeseira relacionada a estresse hídrico* [Dissertação de mestrado]. Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo.
- Ribeiro, R. R., & Spósito, M. B. (2022). Interference of late rust associated with water deficit in the primary metabolism of raspberries. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02476-z>

- Rodrigues, J. A., & Zilberman, D. (2015). Evolution and function of genomic imprinting in plants. *Genes & Development*, 29(24), 2517–2531. <https://doi.org/10.1101/gad.269902.115>
- Samsampour, D., Zanjani, B. M., Pallavi, J. K., Singh, A., Charpe, A., Gupta, S. K., & Prabhu, K. V. (2010). Identification of molecular markers linked to adult plant leaf rust resistance gene Lr48 in wheat and detection of Lr48 in the Thatcher near-isogenic line with gene Lr25. *Euphytica*, 174(3), 337–342. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0114-2>
- Santure, A. W., & Spencer, H. G. (2006). Influence of Mom and Dad: Quantitative Genetic Models for Maternal Effects and Genomic Imprinting. *Genetics*, 173(4), 2297–2316. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.049494>
- Satyaki, P. R. V., & Gehring, M. (2017). DNA methylation and imprinting in plants: machinery and mechanisms. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(2), 163–175. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1279119>
- Sera, G. H., Fonseca, I., Sera, T., Cristina De Batista Fonseca, I., & Ito, D. S. (2010). Resistance to leaf rust in coffee cultivars. *Coffee Science*, 5(1), 59–66. <https://www.researchgate.net/publication/277035935>
- Simmonds, N. W., & Arthur, A. E. (2003). Plant Breeding, Principles. Em B. Thomas, D. J. Murphy, & B. G. Murray (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (1st ed., Vol. 1, pp. 105–112). Elsevier Academic Press.
- Sønsteby, A., & Heide, O. M. (2010). Earliness and fruit yield and quality of annual-fruited red raspberry (*Rubus idaeus* L.): Effects of temperature and genotype. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(4), 341–349. <https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512678>
- Sønsteby, A., Myrheim, U., Heiberg, N., & Heide, O. M. (2009). Production of high yielding red raspberry long canes in a Northern climate. *Scientia Horticulturae*, 121(3), 289–297.
- Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6172–6181.
- Stoskopf, N. C., Tomes, D. T., & Christie, B. R. (1993). *Plant breeding: theory and practice*. Oxford: Westview Press Inc.
- Strik, B. C., Clark, J. R., Finn, C. E., & Bañados, M. P. (2007). Worldwide blackberry production. *HortTechnology*, 17(2), 205–213.
- Stubbs, R. W., Prescott, J. M., Saari, E. E., & Dubin, H. J. (1986). *Cereal disease methodology manual Mexico: Cimmyt*. (Vol. 46). CIMMYT.

- Swanson, J. D., Carlson, J. E., Fernandez-Fernandez, F., Finn, C., Graham, J., Weber, C., & Sargent, D. (2011). Raspberries and blackberries. Em K. Folta & C. Kole (Eds.), *Genetics, genomics and breeding of berries* (pp. 64–78).
- Vogel, K. E. (2009). Backcross Breeding. Em P. M. Scott (Ed.), *Methods in Molecular Biology: Transgenic Maize* (Human Press, Vol. 526, pp. 161–169). [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_14)
- Vrain, T. C., Daubeny, H. A., Hall, J. W., DeYoung, R. M., & Anderson, A. K. (1994). Inheritance of resistance to root lesion nematode in red raspberry. *HortScience*, 29, 1340–1341.
- Walker, J. E. (1969). *Plant Pathology*. McGraw-Hill Book Co.
- Wang, S. Y., Chen, C.-T., & Wang, C. Y. (2009). The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food chemistry*, 112(3), 676–684.
- Williams, I. H. (1959). Effects of environment on *Rubus idaeus* L.: IV. Flower initiation and development of the inflorescence. *Journal of Horticultural Science*, 34(4), 219–228.
- Williamson, B., & Jennings, D. (1986). Common resistance in red raspberry to *Botrytis cinerea* and *Didymella applanata*, two pathogens occupying the same ecological niche. *Annals of Applied Biology*, 109(3), 581–593.
- Williamson, B., & Jennings, D. (1992). Resistance to cane and foliar diseases in red raspberry (*Rubus idaeus*) and related species. Em *Breeding for Disease Resistance* (pp. 59–70). Springer.
- Wolf, J. B., & Wade, M. J. (2016). Evolutionary genetics of maternal effects. *Evolution*, 70(4), 827–839. <https://doi.org/10.1111/evo.12905>
- Yoshida, K., Toyama-Kato, Y., Kameda, K., & Kondo, T. (2003). Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. *Plant and cell physiology*, 44(3), 262–268.
- Zadoks, J. C., & Schein, R. D. (1979). *Epidemiology and plant disease management*. Oxford University Press.

## 7. Anexos

### 7.1. Anexo I



**Figura 23** – Exemplo de folha representativa de um nível de infecção de ferrugem tardia correspondente a 1.



**Figura 24** - Exemplo de folha representativa de um nível de infecção de ferrugem tardia correspondente a 2.



**Figura 25** - Exemplar de folha representativa de um nível de infecção de ferrugem tardia correspondente a 3.

## 7.2. Anexo II



Figura 26 – Ápice no estado vegetativo.



Figura 27 – Estados fenológicos do gomo terminal classificados como botão, compreendidos entre esta classe e a classe de queda da pétala.



**Figura 28** – Estados fenológicos do gomo terminal classificados como queda da pétala (imagem acima à esquerda), compreendidos entre esta classe e a classe colheita.



**Figura 29** – Estado fenológico correspondente a colheita.

### 7.3. Anexo III

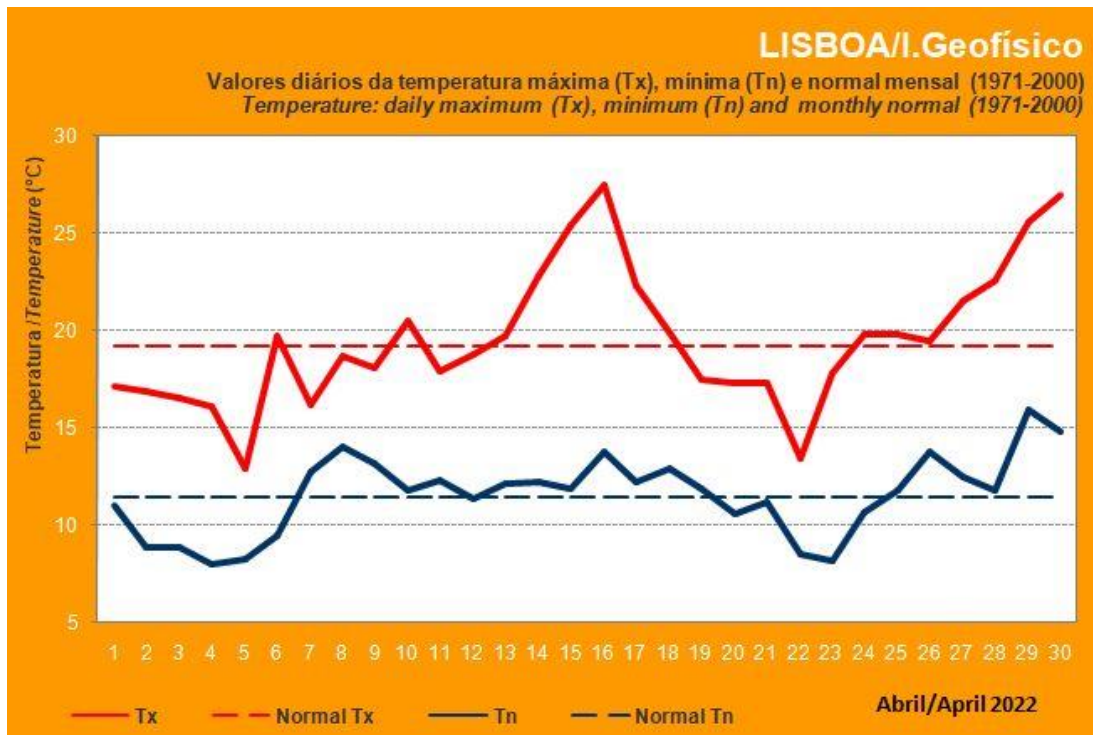


Figura 30 – Valores de temperatura máxima e mínima do ar, para o mês de abril, no distrito de Lisboa (IPMA, 2022a).

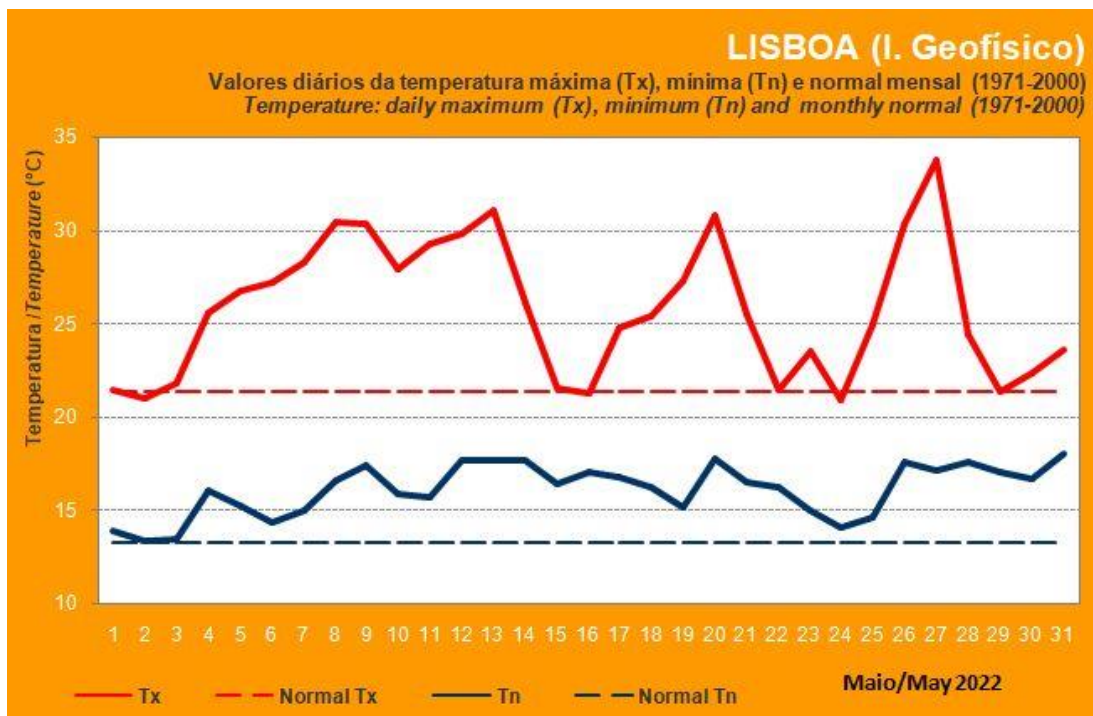


Figura 31 – Valores de temperatura máxima e mínima do ar, para o mês de maio, no distrito de Lisboa (IPMA, 2022a).

## 7.4. Anexo IV

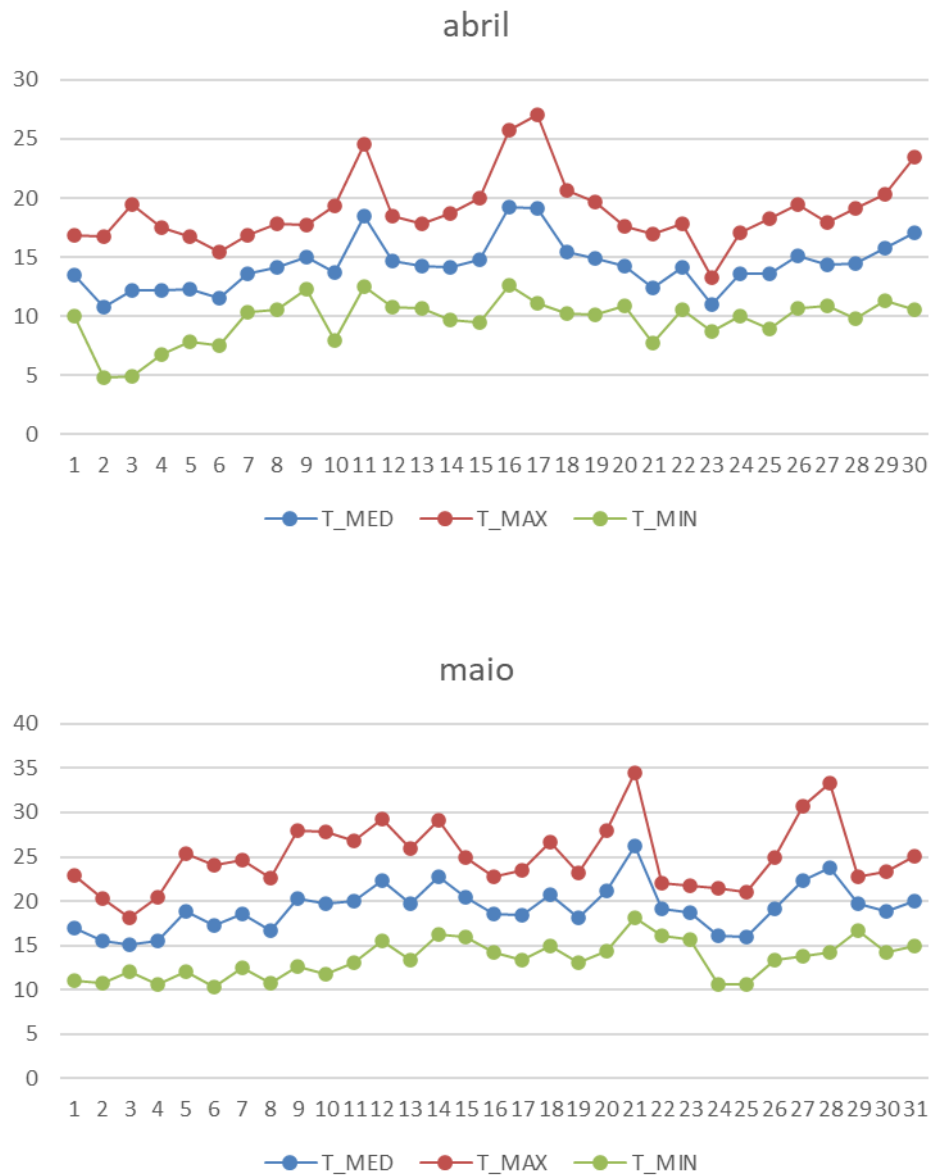


Figura 32 – Valores de temperatura média (T\_MED), máxima (T\_MAX) e mínima (T\_MIN) registados pela estação meteorológica de Odemira-São Teotónio, durante os meses de abril e maio de 2022.