



**UAlg**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

# A NUTRIÇÃO DO MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* DUTCH.):

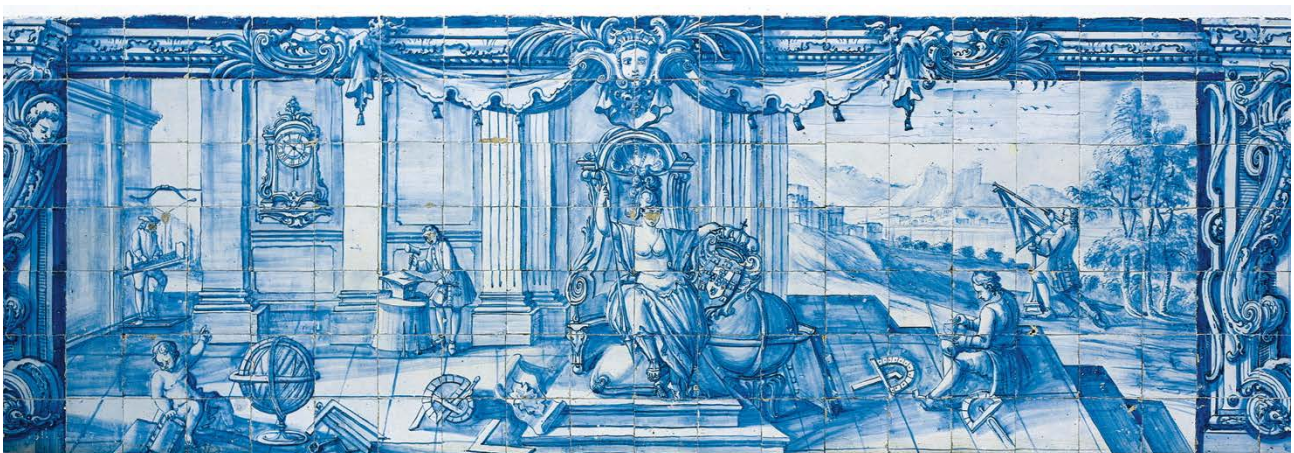
Efeito na fisiologia e qualidade dos frutos

*Camila Borges Antonio Tufik*

Tese apresentada à Universidade de Évora  
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias e Ambientais

ORIENTADORES: *Ana Elisa de Mendonça Rato Barroso*  
*Ana Cristina Pinto Agulheiro Santos*

ÉVORA, DEZEMBRO DE 2017







**UAlg**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

# A NUTRIÇÃO DO MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* DUTCH.):

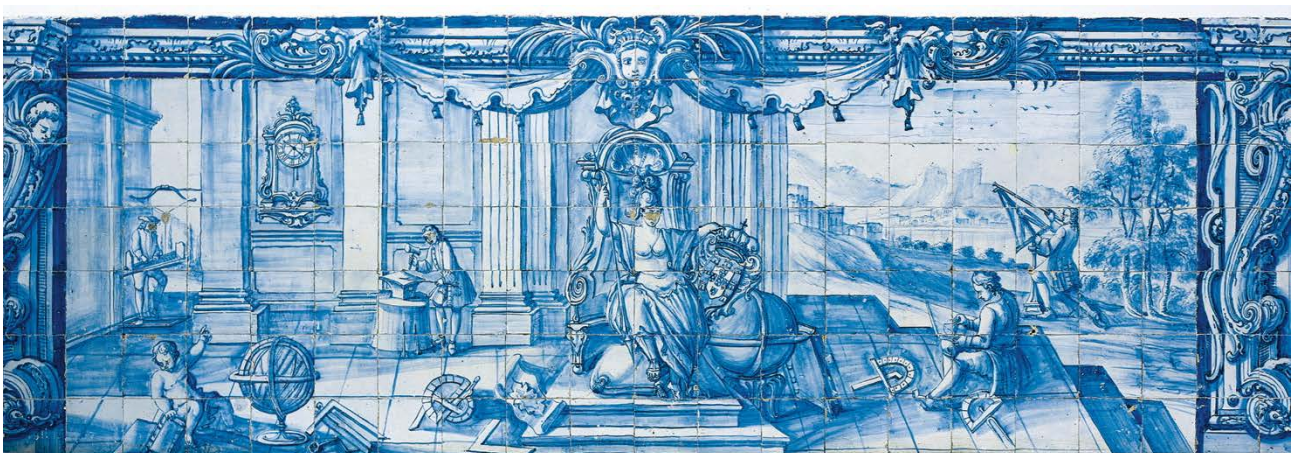
Efeito na fisiologia e qualidade dos frutos

*Camila Borges Antonio Tufik*

Tese apresentada à Universidade de Évora  
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias e Ambientais

ORIENTADORES: *Ana Elisa de Mendonça Rato Barroso*  
*Ana Cristina Pinto Agulheiro Santos*

ÉVORA, DEZEMBRO DE 2017





## **Agradecimentos**

---

A Deus;

À minha família e familiares, especialmente à minha mãe por toda dedicação, paciência, amor e carinho para comigo;

Às minhas orientadoras, Prof<sup>a</sup> Ana Elisa Rato e Prof<sup>a</sup> Ana Cristina Agulheiro pelos anos de acompanhamento, orientação e amizade;

Ao Prof<sup>o</sup> Renato Coelho pela incansável disponibilidade em ajudar e amizade;

À Dra. Hélia Cardoso pelo apoio e disponibilidade em ajudar;

À Universidade de Évora pelo acolhimento;

Ao governo brasileiro, através da Capes e do programa Ciência sem Fronteira pela oportunidade e bolsa de estudo;

À PaxBerry Portugal, em especial ao Eng<sup>o</sup> Hugo Condesso pela disponibilidade, contribuição com materiais e instalações para a realização de ensaios desta tese; e à Eng<sup>a</sup> Ana Silva pela atenção e disponibilidade;

Ao ICAAM pelo apoio financeiro;

Ao Sr. José Abreu pela amizade e suporte durante todos os anos de ensaios na estufa;

Aos amigos em Portugal e aos que mesmo do outro lado do mundo, estão sempre preocupados em me apoiar;

Ao suporte recebido pelos funcionários dos laboratórios de Fisiologia Vegetal, de Biologia Molecular, de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal, de Nutrição e Metabolismo, de Microbiologia do Solo e das Águas;

Às colegas do laboratório de Tecnologia e Pós-colheita Fabiana, Maria Inês, Sara e Joana pelo auxílio com metodologias e equipamentos;

À Zetinha e a Maria das Dores, pelo carinho e atenção durante todos estes anos;

Aos funcionários da Mitra pelo acolhimento e amizade;

À Olívia Matos pelo suporte em dias difíceis;

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para tornarem os meus dias mais felizes (eu não teria como agradecer a todos os portugueses e *Erasmus* maravilhosos que conheci durante a minha estadia em Portugal).

**Os meus sinceros agradecimentos.**



## Índice geral

---

I – Lista de figuras .....	ix
II – Lista de tabelas .....	xi
III – Lista de abreviaturas e símbolos .....	xiv
Resumo .....	xix
Abstract .....	xxi
Prefácio .....	xxiii

### Capítulo I – Introdução Geral

1. Aspectos gerais da cultura do morangueiro .....	1
2. Parâmetros da qualidade do morango .....	3
3. A relação iônica entre potássio e cálcio na solução nutritiva e sua influência no desenvolvimento do morangueiro e na qualidade dos frutos .....	5
3.1 A influência do potássio nos mecanismos de transporte e acumulação de cálcio na célula vegetal .....	8
3.1.1 Proteínas de transporte iônico entre membranas celulares .....	8
3.1.2 O mecanismo de transporte de potássio e o influxo de cálcio em condições de deficiência de potássio .....	10
4. A importância do potássio na fisiologia do morangueiro .....	12
5. A importância do cálcio na qualidade e conservação dos frutos .....	15
5.1 O cálcio e a parede celular .....	15
5.2 O cálcio e o amolecimento dos frutos .....	17
6. A utilização da espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) para avaliação do teor de nutrientes em tecidos vegetais .....	18
6.1 Descrição da tecnologia .....	19
6.2 Utilização da análise multivariada para obtenção de modelos .....	21

### Capítulo II - Efeito de diferentes doses de potássio na fisiologia do morangueiro, na acumulação de K, Ca e Mg, na produção e qualidade de morangos

1. Introdução .....	27
2. Material e métodos .....	29
2.1 Ensaio I – Utilização de um sistema hidropônico contendo areia como substrato .....	29
2.1.1 Instalação do ensaio e obtenção do material vegetal .....	29
2.1.2 Tratamentos e delineamento experimental .....	30

2.1.3	Descrição do sistema hidropônico utilizado .....	30
2.1.4	Preparação e manejo da solução nutritiva .....	31
2.1.5	Plantação e manutenção do ensaio .....	32
2.1.6	Avaliações .....	34
2.1.6.1	Avaliação dos parâmetros fisiológicos das plantas .....	34
	<i>Teor em clorofilas - índice SPAD</i> .....	35
	<i>Fluorescência das clorofilas</i> .....	35
	<i>Condutância estomática e temperatura da folha</i> .....	36
	<i>Potencial hídrico das folhas</i> .....	36
	<i>Porcentagem de água e massas fresca e seca das folhas, folíolos, pecíolos e raízes</i> .....	36
	<i>Conteúdo relativo em água</i> .....	37
	<i>Área específica da folha</i> .....	38
2.1.6.2	Avaliação da produção de morangos .....	38
2.1.6.3	Avaliação do teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta .....	38
	<i>Teor em Ca, K e Mg total nas folhas, pecíolos e raízes</i> .....	38
	<i>Teor em Ca, K e Mg total nos morangos</i> .....	39
	<i>Extração e teor em Ca, K e Mg na parede celular dos morangos</i> .....	39
2.2	Ensaio II – Utilização do sistema hidropônico do tipo NGS® contendo substrato orgânico comercial .....	40
2.2.1	Instalação do ensaio e obtenção do material vegetal .....	40
2.2.2	Tratamentos e delineamento experimental .....	40
2.2.3	Descrição do sistema hidropônico utilizado .....	41
2.2.4	Preparação e manejo da solução nutritiva .....	42
2.2.5	Plantação e manutenção do ensaio .....	44
2.2.6	Avaliações .....	46
2.2.6.1	Avaliação dos parâmetros fisiológicos das plantas .....	46
2.2.6.2	Avaliação da produção de morangos .....	47
2.2.6.3	Avaliação da qualidade físico-química dos morangos .....	47
	<i>Firmeza</i> .....	47
	<i>Cor (L*, h° e C*)</i> .....	47
	<i>Sólidos solúveis totais (SST)</i> .....	48
	<i>Acidez titulável (AT), potencial hidrogeniônico (pH) e razão SST/AT</i> ...	48



2.2.6.4 Teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta .....	49
<i>Teor em Ca, K e Mg total nas folhas e pecíolos</i> .....	49
<i>Teor em Ca, K e Mg total nos morangos</i> .....	49
<i>Extração e teor em Ca, K e Mg na parede celular dos morangos</i> .....	49
2.3 Análise estatística dos dados .....	51
3. Resultados e Discussão .....	51
3.1 Ensaio I – Utilização de um sistema hidropônico contendo areia como substrato .....	51
3.1.1 Efeito das doses de potássio na fisiologia das plantas e na produção de frutos .....	51
3.1.1.1 Fisiologia .....	51
3.1.1.2 Biomassa e produção de frutos .....	57
3.1.2 Efeito das doses de potássio sobre o teor em K, Ca e Mg nos diferentes órgãos da planta e na parede celular dos morangos .....	60
3.1.2.1 Teor em K, Ca e Mg na planta e nos frutos .....	60
3.1.2.2 Teor em K, Ca e Mg na parede celular dos morangos .....	63
3.1.3 Conclusões .....	64
3.2 Ensaio II – Utilização do sistema hidropônico do tipo NGS® contendo substrato orgânico comercial .....	65
3.2.1 Efeito das doses de potássio na fisiologia das plantas, na produção e qualidade dos frutos .....	65
3.2.1.1 Fisiologia .....	65
3.2.1.2 Biomassa e produção de frutos .....	71
3.2.1.3 Efeito das doses de potássio sobre os atributos da qualidade físico-química em morangos .....	73
3.2.2 Efeito das doses de potássio sobre o teor em K, Ca e Mg nos diferentes órgãos da planta e na parede celular dos morangos .....	77
3.2.2.1 Teor em K, Ca e Mg na planta e nos frutos .....	77
3.2.2.2 Teor em K, Ca e Mg na parede celular dos morangos .....	80
3.2.3 Conclusões .....	81
<b>Capítulo III - Influência do potássio na expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no transporte intracelular do cálcio em morangos</b>	
1. Introdução .....	85
2. Material e Métodos .....	87
2.1 Material vegetal, instalação e condução do ensaio .....	87

2.2	Preparação da solução nutritiva .....	88
2.3	Isolamento do RNA total e síntese do DNA complementar .....	89
2.4	Determinação do nível de transcrição por PCR em tempo real .....	90
2.5	Determinação da expressão e estabilidade do gene de referência .....	92
2.6	Análise da expressão gênica .....	93
2.7	Determinação do teor potássio e cálcio nos morangos utilizados no estudo de expressão gênica .....	93
2.8	Análise estatística dos dados .....	93
3.	Resultados e discussão .....	93
3.1	Avaliação da qualidade e integridade do RNA total .....	93
3.2	Avaliação da especificidade de amplificação e eficiência dos <i>primers</i> .....	95
3.3	Seleção dos genes de referência .....	95
3.4	Análise da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de cálcio no fruto em resposta a diferentes doses de potássio aplicadas em morangueiro .....	96
4.	Conclusões .....	102

**Capítulo IV - Avaliação da qualidade e conservação pós-colheita do morango (*Fragaria x ananassa* Dutch. cv. Portola) tratado com CaCl<sub>2</sub> em pré-colheita**

1.	Introdução .....	105
2.	Material e Métodos .....	106
2.1	Localização, material vegetal e instalação do ensaio .....	106
2.2	Tratamentos e condução do ensaio.....	107
2.3	Análises físicas e químicas dos morangos .....	108
	Determinação do teor de Ca total nos morangos .....	108
	Extração e teor de Ca na parede celular dos morangos .....	108
2.4	Quantificação da deterioração dos morangos à temperatura ambiente .....	108
2.5	Desenho experimental e análise estatística dos dados .....	109
3.	Resultados e discussão .....	109
3.1	Efeito do CaCl <sub>2</sub> nos atributos físicos e químicos da qualidade dos morangos .....	109
3.2	Efeito da aplicação de CaCl <sub>2</sub> no teor de cálcio nos morangos .....	121
3.3	Deterioração dos morangos .....	124
4.	Conclusões .....	126

**Capítulo V - Calibração do método rápido baseado na espectroscopia FT-NIR para avaliação do teor de K, Ca e Mg na parede celular de morangos**

1. Introdução .....	131
2. Material e Métodos .....	132
2.1 Obtenção, características das amostras.....	132
2.2 Aquisição dos espectros NIR .....	132
2.3 Pré-tratamentos dos espectros e construção dos modelos .....	132
3. Resultados e discussão .....	134
3.1 Obtenção dos modelos de calibração e validação .....	135
4. Conclusões .....	141
<b>Considerações finais e Perspetivas futuras .....</b>	<b>143</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>173</b>
Anexo 1 .....	175
Anexo 2 .....	178
Anexo 3 .....	181
Anexo 4 .....	188



## I – Lista de figuras

---

- Figura 1.** Esquema representativo das três classes principais de proteínas de transporte localizadas na membrana plasmática das células vegetais: (A) canal, (B) transportadora e (C) bomba. Fonte: adaptado de Taiz e Zeiger (2012) .....9
- Figura 2.** Sobretons (sobreposições) e combinação de bandas na área espectral do NIR. Fonte: Adaptado de Xiaobo *et al.* (2010) .....20
- Figura 3.** Temperaturas máximas e mínimas no interior da estufa durante a condução do ensaio .....33
- Figura 4.** Humidade relativa do ar máxima e mínima no interior da estufa durante a condução do ensaio .....34
- Figura 5.** Sistema NGS® modelo Multibanda DUO®, especialmente desenvolvido para o cultivo do morangueiro. Fonte: ngsystem.com .....42
- Figura 6.** Temperaturas máximas e mínimas no interior da estufa durante a condução do ensaio .....45
- Figura 7.** Humidade relativa do ar máxima e mínima no interior da estufa durante a condução do ensaio .....45
- Figura 8.** Teor em K, Ca e Mg na massa seca dos diferentes órgãos da planta (raízes, pecíolos, folhas e frutos), em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>) .....60
- Figura 9.** Teor em K, Ca e Mg na parede celular dos morangos (média ± erro padrão), em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>) .....63
- Figura 10.** Evolução do peso médio dos frutos, da firmeza (N), dos sólidos solúveis totais (SST), da luminosidade (L\*), do ângulo hue (°h) e do croma (C\*) (média e erro padrão) ao longo das semanas de colheita dos morangos cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>) .....74
- Figura 11.** Teor em K, Ca e Mg na massa seca dos diferentes órgãos da planta (pecíolos, folhas e frutos), em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>) .....79
- Figura 12.** Teor em K, Ca e Mg na parede celular dos morangos (média ± erro padrão), em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>) .....80
- Figura 13.** Imagem representativa da leitura das absorbâncias (efetuada a 230, 260 e 280nm) efetuada em três amostras de RNA total extraído de morango. A curva indicada com a seta a negro corresponde à forma correta que deve apresentar uma amostra de RNA de boa qualidade. A vermelho a curva correspondente a uma amostra com contaminantes detetados a 280nm e a roxo com contaminantes detetados a 230nm ...94
- Figura 14.** Imagem representativa do resultado obtido na avaliação da integridade do RNA total extraído de morangos. No gel é possível observar duas bandas de diferentes pesos moleculares, características do RNA ribossomal 28sRNA e 18sRNA, respetivamente, e a inexistência de bandas de DNA genómico contaminante .....95
- Figura 15.** Valores médios da estabilidade de expressão dos genes de referência 18sRNA, AOX2, *actina* e *GAPDH* .....96

<b>Figura 16.</b> Determinação do número ótimo de genes de referência para a normalização da análise da expressão considerando como valor limite $M < 0,15$ (Vandesompele <i>et al.</i> , 2002) .....	96
<b>Figura 17.</b> Nível de expressão dos genes <i>V-ATPase</i> , <i>PPase</i> , <i>CAX3</i> , <i>CAX5</i> , <i>CAX6</i> , <i>CaATPase1</i> , <i>CaATPase2</i> , <i>CaATPase3</i> , <i>CaATPase4</i> e <i>CaATPase11</i> (média $\pm$ erro padrão) em função das doses de K (2,15; 6,15 e 10,15 mmol L <sup>-1</sup> ) e períodos de colheita (1, 2 e 3) .....	98
<b>Figura 18.</b> Teor em Ca e K total nos morangos em função das doses de K (2,15; 6,15 e 10,15 mmol L <sup>-1</sup> ) e períodos de colheita (1, 2 e 3). Letras maiúsculas representam as diferenças no teor de K nos morangos entre períodos .....	99
<b>Figura 19.</b> Variação média geral da firmeza (N) dos morangos cv. Portola em função do número de aplicações de CaCl <sub>2</sub> .....	111
<b>Figura 20.</b> Variação média do teor de Ca (mg de Ca g de AIR <sup>-1</sup> ) no AIR dos morangos cv. Portola nas diferentes doses de CaCl <sub>2</sub> com 1 e 2 aplicações .....	124
<b>Figura 21.</b> Percentagem (%) de morangos cv. Portola deteriorados nas concentrações 0, 1 e 4% de CaCl <sub>2</sub> com 2 aplicações em função dos dias após a colheita .....	125
<b>Figura 22.</b> Visão geral dos espectros FT-NIR das amostras da parede celular dos morangos (AIR) obtidas no intervalo de 12500 – 3600 cm <sup>-1</sup> .....	132
<b>Figura 23.</b> Retas de calibração obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em cálcio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR) .....	135
<b>Figura 24.</b> Retas de calibração obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em potássio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR) .....	135
<b>Figura 25.</b> Retas de calibração obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em magnésio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR) .....	136
<b>Figura 26.</b> Retas de validação obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em cálcio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR) .....	138
<b>Figura 27.</b> Retas de validação obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em potássio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR) .....	138
<b>Figura 28.</b> Retas de validação obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em magnésio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR) .....	139

## II – Lista de tabelas

---

<b>Tabela 1.</b> Concentração de macronutrientes em soluções nutritivas para o cultivo do morangueiro .....	7
<b>Tabela 2.</b> Trabalhos envolvendo a utilização do NIR para determinação do teor de macro e micronutrientes em diferentes materiais de origem vegetal .....	19
<b>Tabela 3.</b> Concentração de macro e micronutrientes na solução nutritiva utilizada como controle .....	30
<b>Tabela 4.</b> Quantidade expressa em g 240L <sup>-1</sup> das fontes fertilizantes contendo macro e micronutrientes adicionadas à água na formulação da solução nutritiva de acordo com cada tratamento contendo as doses de potássio .....	32
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros fisiológicos avaliados nos morangueiros, local de determinação na planta e número de plantas utilizadas .....	35
<b>Tabela 6.</b> Concentração de macro e micronutrientes na solução nutritiva utilizada como controle .....	41
<b>Tabela 7.</b> Quantidade expressa em g L <sup>-1</sup> das fontes fertilizantes contendo macro e micronutrientes utilizadas na formulação das soluções estoque de acordo com cada tratamento contendo as doses crescentes de potássio .....	43
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros fisiológicos avaliados nos morangueiros, local de determinação na planta e número de plantas utilizadas .....	46
<b>Tabela 9.</b> Índice SPAD nas folhas jovens (FJ) e adultas (FA), índice de desempenho da fotossíntese ( $PI_{abs}$ ) e máxima eficiência quântica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) (média ± erro padrão) avaliados na 13ª semana (1ª avaliação) e 24ª semana (2ª avaliação) após a transplantação dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	51
<b>Tabela 10.</b> Condutância estomática às 10h ( $g_s10h$ ) e às 12h ( $g_s12h$ ), temperatura da folha às 10h ( $tF10h$ ) e às 12h ( $tF12h$ ) e potencial hídrico das folhas ( $\Psi_w$ ) (média ± erro padrão) avaliados na 13ª semana (1ª avaliação) e 24ª semana (2ª avaliação) após a transplantação dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	54
<b>Tabela 11.</b> Percentagem de água (%H <sub>2</sub> O) das folhas, pecíolos e raízes (média ± erro padrão) dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	56
<b>Tabela 12.</b> Percentagem de água (%H <sub>2</sub> O) dos folíolos, conteúdo relativo em água dos folíolos (RWC) e área específica da folha (SLA) (média ± erro padrão) dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	57
<b>Tabela 13.</b> Massas fresca (MF) e seca (MS) das folhas (F), pecíolos (P) e raízes (R) (média ± erro padrão) dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução hidropônica (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	58
<b>Tabela 14.</b> Número e peso médio da produção de morangos (média ± erro padrão) por colheita em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L <sup>-1</sup> ) por semana de colheita .....	59
<b>Tabela 15.</b> Índice SPAD nas folhas jovens (FJ) e adultas (FA), índice de desempenho do fotossistema ( $PI_{abs}$ ) e máxima eficiência quântica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) (média ±	

erro padrão) avaliados na 15ª semana (1ª avaliação) e 33ª semana (2ª avaliação) após a transplantação dos morangueiros cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	65
<b>Tabela 16.</b> Condutância estomática às 10h (g <sub>s</sub> 10h) e 12h (g <sub>s</sub> 12h), temperatura da folha às 10h (tF10h) e 12h (tF12h) e potencial hídrico (Ψ <sub>w</sub> ) na primeira e segunda avaliação (média ± erro padrão) avaliados na 15ª semana (1ª avaliação) e 33ª semana (2ª avaliação) após a transplantação dos morangueiros cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	67
<b>Tabela 17.</b> Percentagem de água (%H <sub>2</sub> O) das folhas e pecíolos, conteúdo relativo em água dos folíolos (RWC) e área específica da folha (SLA) (média ± erro padrão) do morangueiro cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	70
<b>Tabela 18.</b> Massas fresca (MF) e seca (MS) das folhas (F) e pecíolos (P) (média ± erro padrão) do morangueiro cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	71
<b>Tabela 19.</b> Número e peso médio da produção de morangos (média ± erro padrão) por colheita em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L <sup>-1</sup> ) por semana de colheita .....	72
<b>Tabela 20.</b> Peso, sólidos solúveis totais (SST), firmeza, luminosidade (L*), ângulo hue (°h) e croma (C*) dos morangos (média ± erro padrão) em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	75
<b>Tabela 21.</b> Acidez titulável (AT), pH e razão SST/AT total dos morangos (média ± erro padrão) em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L <sup>-1</sup> ) .....	76
<b>Tabela 22.</b> Periodicidade e volume da rega após a transplantação dos morangueiros .....	88
<b>Tabela 23.</b> Quantidade (g L <sup>-1</sup> ) das fontes minerais contendo macronutrientes adicionadas à água na formulação da solução nutritiva de acordo com cada tratamento contendo as doses crescentes de potássio .....	89
<b>Tabela 24.</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados neste estudo e outros parâmetros considerados relevantes .....	91
<b>Tabela 25.</b> Variação média da firmeza (N) dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> em pré-colheita .....	110
<b>Tabela 26.</b> Variação média dos parâmetros da cor L*, h° e C* dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> em pré-colheita .....	112
<b>Tabela 27.</b> Variação média dos SST (°Brix) dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> em pré-colheita .....	115
<b>Tabela 28.</b> Variação média da AT (% de ácido cítrico) dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> em pré-colheita .....	118
<b>Tabela 29.</b> Variação média do pH dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> em pré-colheita .....	119



<b>Tabela 30.</b> Variação média do teor de SST/AT dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> em pré-colheita .....	120
<b>Tabela 31.</b> Variação média do teor de Ca total (mg de Ca g de morango liofilizado <sup>-1</sup> ) nos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> em pré-colheita .....	122
<b>Tabela 32.</b> Variação média do teor de Ca (mg de Ca g de AIR <sup>-1</sup> ) no AIR dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> em pré-colheita .....	123
<b>Tabela 33.</b> Região do espectro e pré-tratamentos utilizados para construção do modelo de calibração para o cálcio, potássio e magnésio .....	131
<b>Tabela 34.</b> Valores médios de referência (VR), valores previstos pelo FT-NIR (VP) e diferença entre os VR e VP (Dif.) para os teores de cálcio, potássio e magnésio na parede celular dos morangos (mg g <sup>-1</sup> de AIR) .....	133
<b>Tabela 35.</b> Parâmetros estatísticos para obtenção do modelo PLSR de calibração e validação cruzada para os teores de cálcio, potássio e magnésio na parede celular dos morangos (AIR) .....	134

### III – Lista de abreviaturas e símbolos

---

$\Delta Ct$	método do delta- <i>cycle threshold</i>
%H <sub>2</sub> O	percentagem de água
$\Sigma$	somatório
$\Sigma AF$	somatório da área dos folíolos
$\Psi_w$	potencial hídrico
18sRNA	18S ribossomal ácido ribonucleico
28sRNA	28S ribossomal ácido ribonucleico
a*	componente cromática do vermelho/verde
AIR	<i>alcohol insoluble residue</i>
Ampl.	tamanho do amplicão
Anova	análise de variância
AOX2	oxidase alternativa 2
Arctan	arco tangente
AT	acidez titulável
ATP	adenosina trifosfato
ATPases	adenosina trifosfatases
B	boro
b*	componente cromática do amarelo/azul
Bias	tendência ou viés
C*	croma
Ca	cálcio
Ca <sup>2+</sup>	ião divalente de cálcio
Ca-ATPase	cálcio adenosinatrifosfatase
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	cloreto de cálcio di-hidratado
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	fosfato de cálcio
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	nitrato de cálcio
CaSO <sub>4</sub>	sulfato de cálcio
CAXs	proteínas permutadoras de protões e catiões
CE	condutividade elétrica
CH <sub>2</sub> -	molécula do grupo orgânico metileno
CH <sub>3</sub> -	molécula do grupo orgânico metil
C.I.E L*a*b*	escala de uniformização da cor
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
COO-	grupo carboxílico
Cq	ciclo de quantificação
Cu	cobre
cv.	cultivar
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase	desoxirribonuclease
E	eficiência de amplificação de pares de <i>primers</i>
EtBr	brometo de etídio
F <sub>0</sub>	valor mínimo de fluorescência da clorofila
FA	folha adulta

<b>FAR</b>	região do infravermelho distante
<b>Fe</b>	ferro
<b>Fe-EDDHA</b>	ácido etilenodiamina - N, N'- bis (2-hidroxifenilacético)
<b>FJ</b>	folha jovem
<b>F<sub>m</sub></b>	valor máximo de fluorescência da clorofila
<b>FSI</b>	fotossistema I
<b>FSII</b>	fotossistema II
<b>FT-NIR</b>	transformada de <i>Fourier</i> na região do infravermelho próximo
<b>F<sub>v</sub></b>	fluorescência variável
<b>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></b>	eficiência máxima do fotossistema II
<b>Fw</b>	<i>primer</i> iniciador
<b>GAPDH</b>	gliceraldeído 3-fosfatase desidrogenase
<b>GR</b>	genes de referência
<b>g<sub>s</sub></b>	condutância estomática
<b>g<sub>s</sub>10h</b>	condutância estomática às 10 horas
<b>g<sub>s</sub>12h</b>	condutância estomática às 12 horas
<b>h°</b>	ângulo hue
<b>H<sub>2</sub>O</b>	molécula de água
<b>H<sup>+</sup></b>	protão de hidrogénio
<b>H<sup>+</sup>-ATPase</b>	protão adenosinatrifosfatase
<b>HClO<sub>4</sub></b>	ácido perclórico
<b>HNO<sub>3</sub></b>	ácido nítrico
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	ião fosfato
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	fosfato
<b>HR<sub>máx</sub></b>	humidade relativa do ar máxima
<b>HR<sub>mín</sub></b>	humidade relativa do ar mínima
<b>K</b>	potássio
<b>K<sup>+</sup></b>	ião monovalente de potássio
<b>K<sub>2</sub>O</b>	óxido de potássio
<b>K: Ca</b>	relação entre o potássio e o cálcio
<b>K: Ca: Mg</b>	relação entre o potássio, o cálcio e o magnésio
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>KNO<sub>3</sub></b>	nitrato de potássio
<b>L*</b>	luminosidade
<b>MAP</b>	fosfato monoamónico
<b>Mg</b>	magnésio
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	ião divalente de magnésio
<b>Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	nitrato de magnésio
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	sulfato de magnésio
<b>MID</b>	região do infravermelho médio
<b>MF</b>	massa fresca
<b>MFF</b>	massa fresca da folha
<b>MFP</b>	massa fresca do pecíolo
<b>MFR</b>	massa fresca da raiz
<b>Mn</b>	manganês
<b>Mo</b>	molibdénio
<b>MS</b>	massa seca
<b>MSF</b>	massa seca da folha
<b>MSP</b>	massa seca do pecíolo

<b>MSR</b>	massa seca da raiz
<b>N</b>	azoto
<b>Na<sup>+</sup></b>	ião monovalente de sódio
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	nitrato de sódio
<b>NaOH</b>	hidróxido de sódio
<b>NGS<sup>®</sup></b>	<i>new growing system</i>
<b>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	di-hidrogenofosfato de amônio
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	nitrato de amónio
<b>NIR</b>	região do infravermelho próximo
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	azoto na forma de amónia
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	azoto na forma de nitrato
<b>NTCs</b>	controlos negativos
<b>OH-</b>	molécula do grupo orgânico hidroxila
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	pentóxido de fósforo
<b>P. A</b>	puro para análise
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>PEBD</b>	polietileno expandido de baixa densidade
<b>pH</b>	potencial hidrogeniónico
<b>PI<sub>ABS</sub></b>	índice de desempenho da fotossíntese
<b>PLSR</b>	regressões de mínimos quadrados parciais
<b>PPase</b>	pirofosfatase
<b>PT</b>	peso túrgido
<b>PVC</b>	policloreto de vinil
<b>QR</b>	quantidade relativa
<b>r</b>	coeficiente de correlação de Pearson
<b>R<sup>2</sup></b>	coeficiente de determinação
<b>RMSEC</b>	raiz quadrada da soma dos erros da calibração
<b>RMSECV</b>	raiz quadrada da soma dos erros da calibração cruzada
<b>RMSEP</b>	raiz quadrada do erro de previsão
<b>RMSEV</b>	raiz quadrada da soma dos erros da validação
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	<i>oxygen-reactive species</i>
<b>RPD</b>	desvio residual da predição
<b>RTqPCR</b>	<i>real time quantification polymerase chain reaction</i>
<b>RuBP</b>	ribulose - 1,5 - bifosfatase (Rubisco)
<b>Rv.</b>	<i>primer</i> reverso
<b>RWC</b>	conteúdo relativo em água
<b>SH-</b>	molécula do grupo orgânico tiol
<b>SLA</b>	área específica da folha
<b>Slope</b>	declive da reta
<b>SNV</b>	normalização
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	ião divalente de sulfato
<b>SPAD</b>	índice do teor de clorofila
<b>SPADFA</b>	índice do teor de clorofila na folha adulta
<b>SPADFJ</b>	índice do teor de clorofila na folha jovem
<b>SST</b>	sólidos solúveis totais

<b>TAE</b>	tampão tris acetato EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)
<b>tF</b>	temperatura da folha
<b>tF10h</b>	temperatura da folha às 10 horas
<b>tF12h</b>	temperatura da folha às 12 horas
<b>Tm</b>	temperatura de Melt
<b>Tmáx</b>	temperatura máxima
<b>Tmín</b>	temperatura mínima
<b>V-ATPase</b>	vacuolar adenosinatrifosfatase
<b>v/v</b>	volume/volume
<b>Zn</b>	zinco



## Resumo

---

### **A nutrição do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Dutch.): Efeito na fisiologia e qualidade dos frutos**

O fornecimento de níveis adequados de nutrientes ao morangueiro, principalmente aqueles relacionados com a qualidade dos frutos, como o potássio e o cálcio, é fundamental para potencializar a produção de morangos e elevar a qualidade pós-colheita. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da nutrição mineral, em especial a nutrição potássica na fisiologia e qualidade pós-colheita de morangos. O trabalho, incluiu a realização de cinco ensaios, dois dos quais para avaliar o efeito de diferentes doses de potássio adicionadas à solução nutritiva dos morangueiros cultivados em sistema hidropônico sobre a fisiologia das plantas, produção e qualidade dos frutos. O terceiro teve como objetivo verificar se diferentes concentrações de potássio fornecidas ao morangueiro influenciavam a expressão de genes que codificam proteínas transportadoras de cálcio nas células dos frutos. O quarto, avaliou os efeitos do número de aplicações de diferentes concentrações de cloreto de cálcio nos frutos em pré-colheita na manutenção da qualidade e conservação dos morangos, e o quinto, teve como objetivo avaliar a potencialidade da espectroscopia com transformação de *Fourier* na região do infravermelho próximo (FT-NIR) para determinar o teor de potássio, cálcio e magnésio na parede celular dos morangos. Verificou-se que a concentração de potássio na solução nutritiva influenciou significativamente a produtividade e o teor de Ca nos diferentes órgãos da planta e parede celular dos frutos. As diferentes concentrações de potássio fornecidas aos morangueiros alteraram a expressão dos genes que codificam proteínas transportadoras de cálcio, pelo que o excesso de potássio prejudicou a acumulação do cálcio nas células dos frutos. A utilização do cloreto de cálcio em pré-colheita mostrou-se benéfica para a manutenção da qualidade dos frutos. Os modelos matemáticos obtidos para o potássio e para o magnésio utilizando o espectrómetro FT-NIR são recomendados para determinação do teor destes elementos na parede celular dos morangos.

**Palavras-chave:** morangos, potássio, cálcio, expressão génica, FT-NIR.





## Abstract

---

### **The strawberry nutrition (*Fragaria x ananassa* Dutch.): Effect on physiology and fruit quality**

The management of nutrients in hydroponic solutions, especially those related to fruit quality, such as potassium and calcium, is fundamental to potentiate the production of strawberries and raise fruit quality during postharvest. The main goal of this study was to assess the effects of mineral nutrition of strawberries on physiology and fruit quality. This work includes five trials, two of which were carried out to evaluate the effect of different potassium doses in the nutrient solution on the physiology and fruit quality of plants cultivated in a hydroponic system. A third trial was carried out to verify if different potassium doses provided to the strawberries influenced the expression of genes that encode calcium transport proteins in strawberry cells. A fourth trial was conducted to evaluate the effects of different concentrations of calcium chloride applications to the fruits during preharvest, on the maintenance of postharvest fruit quality. The fifth trial had the objective of investigating the potential of NIR spectroscopy with *Fourier Transformation* to evaluate the potassium, calcium and magnesium contents in strawberry cell walls. The results show that the concentration of potassium in the nutrient solution significantly influenced the productivity and the Ca content in the different organs of the plant and cell wall of the fruits. The different concentrations of potassium provided to the strawberries altered the expression genes encoding calcium transporter proteins, so that the excess of potassium was detrimental to the distribution of calcium in the cells of the fruits. Preharvest calcium chloride applications contributed significantly to the maintenance of fruit quality. Relevant correlations were obtained in the models to evaluate potassium and magnesium in fruit cell walls using FT-NIR spectroscopy.

**Key-words:** strawberries, potassium, calcium, gene expression, FT-NIR.



## Prefácio

---

### Enquadramento do problema em estudo

Um fator determinante para a produção e para a qualidade pós-colheita dos frutos é a nutrição fornecida às plantas. A dinâmica de absorção dos diferentes catiões é variável de acordo com a sua concentração na solução nutritiva, o que pode resultar em fenómenos de competição iónica e, por consequência, em alterações na qualidade dos frutos. De todos os nutrientes utilizados nas culturas de fruteiras, o potássio é aquele que é frequentemente usado com o objetivo de melhorar a cor e os níveis de sólidos solúveis dos frutos, pelo que é muitas vezes conhecido pelo 'elemento da qualidade'. O potássio é dos elementos minerais das plantas, o segundo exigido em maior quantidade e que interfere em vários processos fisiológicos; desde o equilíbrio osmótico das células, permeabilidade da membrana celular, abertura e fecho estomático e ativação de vários sistemas enzimáticos. Pelos efeitos potenciadores da qualidade dos frutos associados à presença de potássio, muitos são os trabalhos acerca da deficiência deste elemento e das consequências que daqui surgem. A deficiência deste catião é frequentemente associada à perda de capacidade fotossintética das plantas e, consequentemente, à perda da qualidade dos frutos. No entanto, poucas são as referências acerca dos efeitos do excesso associados à este catião.

Este elemento não apresenta facilmente níveis de toxicidade para as plantas, pelo que a sua aplicação, é por vezes, prática recorrente entre produtores. É do conhecimento empírico que o excesso de potássio é potenciador de *bitter-pit* em maçã variedade Reineta, assim como reduz a capacidade de conservação de algumas variedades de pera. Alguns estudos referem que a presença deste elemento em excesso interfere com a razão K:Ca e, que a alteração desta relação vai influenciar a capacidade de conservação dos frutos e, consequentemente, a qualidade dos mesmos. O conhecimento dos efeitos associados quer, à deficiência quer ao excesso de potássio e as consequências que daqui advêm para a qualidade, é de fundamental importância para quem produz. Com o objetivo de perceber a influência do potássio no desenvolvimento dos morangueiros, na produção e na qualidade dos morangos foram elaborados dois ensaios que estão apresentados no capítulo II desta tese. No primeiro ensaio optou-se por um substrato inerte (areia) tendo o efeito da nutrição potássica sido avaliado nestas condições. No segundo ensaio optou-se por um sistema hidropónico comercial com utilização de substrato orgânico para haver uma aproximação às condições reais da cultura.

A maioria dos nutrientes absorvidos pelas plantas, estejam eles em excesso ou em déficit, requerem a ação de uma grande variedade de proteínas transportadoras que asseguram o seu movimento através dos diferentes compartimentos celulares. O excesso ou a deficiência de um mineral pode levar, não só ao aparecimento de sintomas de toxicidade ou deficiência, mas desencadear processos fisiológicos ao nível molecular que influenciam a acumulação ou deficiência de outros minerais. Com o objetivo de perceber como é que a presença de potássio condicionava, ao nível molecular, a acumulação e redistribuição de cálcio no citosol foi elaborado um ensaio que está apresentado no capítulo III.

A deterioração dos morangos é resultado da sua intensa atividade metabólica e manifesta-se por uma perda acentuada da firmeza dos frutos. A suscetibilidade aos danos mecânicos é um sintoma que surge com maior intensidade em frutos que apresentam desequilíbrios na relação K:Ca. A relativa imobilidade do cálcio nos frutos leva a que a aplicação direta deste catião na epiderme dos mesmos seja uma prática que se está a vulgarizar entre produtores. A utilização de cloreto de cálcio na epiderme dos morangos é proposta como economicamente viável e com potencial para a manutenção da qualidade pós-colheita. Com o objetivo de avaliar os efeitos que as aplicações do cloreto de cálcio têm na manutenção da estrutura da parede celular e, conseqüentemente, na manutenção da qualidade e conservação dos frutos, foi elaborado um ensaio que esta apresentado no capítulo IV.

O controlo do estado nutricional das plantas é uma prática importante entre produtores e o resultado destas análises químicas permitem identificar distúrbios nutricionais causados por excesso ou deficiência mineral servindo como orientação para programas equilibrados de fertilização. Atualmente o controlo do teor de nutrientes nos frutos e no material vegetal em geral, efetua-se por metodologias morosas e dispendiosas, pelo que o desenvolvimento de uma metodologia que se mostre eficaz na determinação do teor de nutrientes ao nível das paredes celulares é de fundamental importância. Assim no capítulo V deste trabalho é proposta uma técnica de análise rápida à fração das paredes celulares de morango de forma a obter-se a informação acerca da sua composição nutricional, nomeadamente no que diz respeito ao efeito dos níveis de potássio no teor de cálcio das paredes celulares.

## **Capítulo I**

### **Introdução Geral**

---



### 1. Aspetos gerais da cultura do morangueiro

O género *Fragaria* pertence à família Rosaceae, subfamília Rosoideae e inclui aproximadamente 22 espécies silvestres distribuídas por todas as regiões cultiváveis do globo terrestre, sendo a *Fragaria x ananassa* Dutch., o híbrido interespecífico economicamente mais importante (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2009).

*F. vesca* ou morango dos Alpes foi a primeira espécie domesticada por antigas civilizações gregas e romanas no continente europeu antes da descoberta do continente Americano. Por volta do ano 1300, esta planta já estava a ser cultivada por toda a Europa (Darrow, 1966; Hummer e Hancock, 2009) e, em meados do ano de 1600, começou a ser substituída pela espécie norte americana *F. virginiana* (Hancock *et al.*, 2008).

No início do ano de 1700 a espécie chilena *F. chiloensis* foi trazida para a Europa pelo oficial do exército francês Amédée Frézier (Hummer e Hancock, 2009). Esta espécie já havia sido domesticada há cerca de mil anos por povos indígenas chilenos e foi amplamente difundida pelos espanhóis nos países da América Latina no período da colonização (Hancock *et al.*, 2008).

O híbrido *F. x ananassa* surgiu do cruzamento natural das espécies *F. virginiana* e *F. chiloenses* quando as mesmas foram plantadas lado a lado num jardim em França e deste cruzamento resultaram plantas com características morfológicas únicas e frutos com aparência e aroma muito atrativos (Hummer e Hancock, 2009). Em 1766, o botânico francês Antoine Nicholas Duchesne reconheceu este híbrido como sendo “ananassa” devido ao aroma característico do fruto que lembrava o do ananás (*Ananas comosus*) (Hancock *et al.*, 2008; Hummer e Hancock, 2009).

O morangueiro é uma planta herbácea de pequeno porte, rasteira e perene que habitualmente é cultivada como anual ou bianual. É polinizada maioritariamente por insetos e tem a capacidade de se reproduzir vegetativamente através da emissão de estolhos (Johnson *et al.*, 2014). Possui sistema radical superficial e ramificado, em que a maior parte das raízes se localizam nos primeiros 20 cm de profundidade. O caule é curto e cilíndrico e dele emergem as folhas agrupadas em espiral em torno do eixo em forma de roseta, cujo conjunto é chamado coroa. A planta pode apresentar mais de uma coroa de onde emergem, além das folhas, as inflorescências, os estolhos, as coroas ramificadas e as raízes adventícias (Palha, 2005).

As folhas são do tipo compostas, com três ou cinco folíolos de coloração verde, variando de tonalidade mediante a cultivar ou variedade do morangueiro. Cada folha apresenta um pecíolo inserido na base da coroa protegido por um par de estípulas. Nestas estípulas encontram-se os gomos, ou gemas, que podem evoluir para estolho ou novas coroas (Palha, 2005).

Os estolhos são caules prostrados especializados na propagação vegetativa da planta. Contudo, o morangueiro pode também propagar-se de forma sexuada, via semente. No entanto, esta forma de propagação é mais utilizada para fins de melhoramento genético (Galvão *et al.*, 2014).

As flores desenvolvem-se numa inflorescência terminal contendo normalmente quinze flores (uma flor primária, duas secundárias, quatro terciárias e oito quaternárias). São actinomorfas com cinco pétalas e sépalas (que podem variar entre seis e oito dependendo da cultivar), possuem brácteas, agrupam-se em corimbos e são de coloração branca por vezes ligeiramente rosadas (Liston *et al.*, 2014). Esta espécie apresenta flores hermafroditas, com estames, pistilos e anteras facilmente distinguíveis, dispostos em espiral sobre o receptáculo. A fecundação dos óvulos pode ser realizada pelo pólen da própria flor quando se dá a deiscência das anteras e esta cai diretamente sobre os pistilos, ou pelo pólen de flores da mesma planta ou de plantas diferentes trazidos por polinizadores (Palha, 2005).

Após a fecundação, forma-se um fruto múltiplo de aquênios, o “morango”, que é assim denominado por ser um agregado de aquênios desenvolvidos num receptáculo carnudo (Liston *et al.*, 2014). Para Sanhueza *et al.* (2011), os frutos verdadeiros são os aquênios duros e superficiais, vulgarmente conhecidos como sendo as “sementes”, que podem chegar até 200, ou ainda, em frutos maiores, totalizar 400 aquênios.

O morango é o pequeno fruto mais apreciado e consumido em todo o mundo e devido à sua importância, existem vários programas de melhoramento genético do morangueiro, principalmente nos Estados Unidos da América que visam desenvolver cultivares adaptadas a diferentes condições climáticas das regiões produtoras e preferências do mercado consumidor (consumo *in natura*, gastronómico e industrial).

A cultura do morangueiro abrange ampla distribuição geográfica devido à sua grande diversidade genética, que conta com inúmeras cultivares e híbridos com alta capacidade de adaptação às condições climáticas e de cultivo (Morales *et al.*, 2012). É cultivado especialmente em países do hemisfério norte, em que o clima temperado favorece a obtenção de alta produtividade.

Segundo o último levantamento feito pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) em 2014, os países que apresentam maior produtividade para



a cultura são os Estados Unidos da América, com 565 854 kg ha<sup>-1</sup> de frutos, seguido pelo México (460 538 kg ha<sup>-1</sup>), Espanha (374 673 kg ha<sup>-1</sup>), Turquia (280 168 kg ha<sup>-1</sup>) e China (274 351 kg ha<sup>-1</sup>) (Faostat, 2017).

Em Portugal, a produção do morangueiro apresenta elevada importância socioeconómica, sendo a área total cultivada em 2014 de 450 ha (Faostat, 2017) e a produção em 2015 de 9 659 t (Instituto Nacional de Estatística, 2016). A produção de morangos no país ocorre praticamente durante todo o ano, sendo a época de maior oferta de frutos correspondente ao período da primavera. Na região do Alentejo é possível suprir a procura pelo fruto no período de outono e inverno uma vez que muito do morango cultivado se encontra em ambiente protegido e a região dispõe de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da cultura.

## **2. Parâmetros da qualidade do morango**

Entende-se por qualidade, um conjunto de atributos, propriedades ou natureza de um objeto, que quando comparado com outro, apresenta superioridade ou excelência (FAO, 2004). No caso de produtos agrícolas, a qualidade pode ser definida como um conjunto de componentes presentes nos mesmos que determinam a sua aceitação pelo consumidor. Os atributos da qualidade dos frutos do morangueiro têm em consideração os aspetos que conferem atratividade, relacionados com a aparência dos frutos, durabilidade, sabor, odor, valor nutricional e segurança alimentar, que abrange a qualidade microbiológica e contaminantes químicos (Mditshwa *et al.*, 2017).

A cor é a primeira característica observada nos frutos de acordo com Moura *et al.* (2012) e também é o que pré-determina a qualidade visual do produto. Da família dos compostos fenólicos (que se divide em flavonoides, ácidos fenólicos e cumarina), os pigmentos antocianinas, são os flavonoides responsáveis pela cor vermelha desta fruta e sabe-se que tais compostos são instáveis e facilmente degradáveis (Aaby *et al.*, 2012).

O aroma é um dos atributos sensoriais primordiais na qualidade do morango que demonstra que o aroma deste fruto está intimamente ligado ao sabor. Cerca de 20 compostos voláteis (ésteres, alcaloides e fenóis) contribui para o aroma característico do fruto e existem diferenças quantitativas e qualitativas destes compostos entre diferentes cultivares de morango (Forney *et al.*, 2000). O equilíbrio adequado entre açúcares, ácidos e compostos voláteis contribuem significativamente para o sabor único do morango.

Os açúcares, sacarose, glucose e frutose são os predominantes na constituição da fração correspondente aos sólidos solúveis no morango e são responsáveis por mais de 99% dos açúcares totais dos frutos maduros (Basson *et al.*, 2010; Whitaker *et al.*, 2011; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2012). A contribuição da sacarose para a qualidade do fruto foi estudada por Schwieterman *et al.* (2014) em trinta e cinco cultivares comerciais de morango, e concluíram que esta contribuía significativamente para a variação no teor de açúcar total do fruto, bem como para a variação da intensidade da doçura e do sabor.

Os ácidos também afetam diretamente o sabor, além de serem importantes para a gelificação das pectinas, regulam o pH celular e podem influenciar na pigmentação dos tecidos do fruto. O principal ácido presente no morango é o ácido cítrico (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2012; Schwieterman *et al.*, 2014), estando também presentes em menor quantidade o ácido málico e em quantidade pouco expressiva os ácidos glicólico e chiquímico, de acordo com Woodward (1972) citado por Montero *et al.* (1996).

A textura é um atributo crítico para a aceitabilidade do consumidor de frutos e vegetais frescos, especialmente quando estes são consumidos *in natura*. A textura macia do morango é extremamente atrativa para o consumidor, porém é um fator problemático para produtores e comerciantes devido à sua elevada fragilidade e à suscetibilidade aos danos.

O morango é um fruto que sofre uma rápida perda de firmeza durante a maturação, o que contribui substancialmente para a uma curta vida pós-colheita e suscetibilidade à contaminação por microrganismos patogénicos (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008). As propriedades da textura do fruto são afetadas pela turgidez das células e pela estrutura e composição dos polissacarídeos da parede celular (Brummell e Harpster, 2001). A base bioquímica do amolecimento do morango não é clara; porém tem sido associado à degradação da lamela média da parede celular das células do parênquima cortical, devido às modificações provocadas pela atuação de várias enzimas, dentre elas a poligalacturonase, a celulase, a pectina metil esterase, a pectato liase, a  $\beta$ -galactosidase, a endo-1 $\rightarrow$ 4- $\beta$ -D-glucanase, a xiloglucano endo-transglicolisilase, a ramnogalacturonase e a expansina (Brummell e Harpster, 2001; Payasi *et al.*, 2009). A ação destas enzimas resulta num aumento da solubilização da pectina, com ligeiras alterações no peso molecular da mesma e pequenas diminuições no conteúdo das hemiceluloses da parede celular dos frutos (Heng Koh e Melton, 2002).

Além do sabor, a qualidade nutricional tem sido cada vez mais considerada pelo consumidor. Frutos de morangos contêm componentes dietéticos importantes, incluindo vitaminas, minerais, ácido fólico e fibras, e são uma rica fonte de compostos fitoquímicos principalmente representados pelos polifenóis ácido elágico, ácido p-cumárico; pelos

flavonoides quercetina, kaempferol, miricetina, além das antocianinas (Panico *et al.*, 2009; Ariza *et al.*, 2016). O morango é principalmente rico em vitamina C, potássio, cálcio e fósforo (Giampieri *et al.*, 2012). Estes teores podem variar em função da cultivar e do sistema cultivado, porém em 100g de fruto fresco em média há 58,8 mg de vitamina C, 153 mg de potássio, 16 mg de cálcio e 24 mg de fósforo (Usda Department of Agriculture, 2017).

Pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, o consumo de morangos tem-se mostrado benéfico contra doenças crônicas, cardiovasculares, proliferativas e neurológicas (Mink *et al.*, 2007; Huntley, 2009; Basu *et al.*, 2010; Yang e Kortensniemi, 2015).

### **3. A relação iônica entre potássio e cálcio na solução nutritiva e sua influência no desenvolvimento do morangueiro e na qualidade dos frutos**

Os nutrientes fornecidos às plantas são determinantes para o desenvolvimento do morangueiro e para a produtividade e qualidade pós-colheita dos frutos. Segundo Mengel (2007), a dinâmica de absorção de cátions é variável, dependendo da concentração destes na solução nutritiva, da sua permeabilidade ao nível das membranas celulares e do seu mecanismo de absorção, além das relações iônicas entre nutrientes, que podem resultar em fenômenos de competição iônica. Nesta situação, o aumento da concentração de um determinado cátion no meio pode diminuir a absorção de outros elementos pela planta.

Quando a concentração de nutrientes na solução nutritiva é alta, dificulta a absorção de água, podendo gerar um *stress* hídrico que se reflete em problemas no crescimento e perda de produtividade pela planta (Andriolo *et al.*, 2009). Por outro lado, quando a concentração de nutrientes na solução nutritiva é baixa ocasiona tanto a diminuição do teor em massa seca vegetal quanto a perda de qualidade e da produção de frutos (Lorenzo *et al.*, 2003).

No cultivo sem solo, a composição da solução nutritiva e em particular, a relação iônica entre o potássio e cálcio (K:Ca), tem sido sugerida como um dos critérios de manejo fundamental para o desenvolvimento e crescimento do morangueiro, para reduzir a ocorrência de malformações (Sharma e Singh, 2008) e para melhorar a qualidade dos morangos (Lieten, 2006).

O potássio (K) é um cátion absorvido em grande quantidade pelas raízes na forma iônica  $K^+$ , sendo transportado para a parte aérea através do xilema. A sua redistribuição na planta ocorre através do floema, dirigindo-se dos tecidos mais velhos

da planta para os mais novos, que normalmente são os tecidos merismáticos ou os frutos em crescimento. A alta mobilidade do K nos tecidos vegetais deve-se ao facto deste elemento não está ligado a nenhum composto orgânico (Wang e Wu, 2013) e ao elevado número de sistemas transportadores envolvidos no transporte de K desde as raízes até à parte aérea das plantas (Lebaudy *et al.*, 2007).

O catião cálcio (Ca), por sua vez, é predominantemente absorvido do meio de crescimento das plantas de forma passiva, na forma iónica  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo transportado no xilema pelo processo de fluxo de massa. A absorção ativa do  $\text{Ca}^{2+}$  só ocorre se a concentração deste elemento na solução nutritiva for menor que a concentração no interior da planta, forçando-a a absorver o nutriente contra um gradiente eletroquímico (Malavolta, 2006). Após absorção, o  $\text{Ca}^{2+}$  é transportado para o xilema, sendo encaminhado para a parte aérea com auxílio do processo de transpiração da planta. A redistribuição desse nutriente na planta praticamente não ocorre porque ele é pouco móvel no floema (Prado, 2008). De acordo com White e Broadley (2003), a maior parte do Ca está contida na forma de pectatos de cálcio, constituindo a lamela média das paredes celulares. Além da acumulação sob esta forma, este elemento também se encontra na forma de sais cálcicos de baixa solubilidade, tais como carbonato, sulfato, fosfato, silicato, citrato, malato e oxalato. Os processos de absorção, transporte e distribuição do  $\text{Ca}^{2+}$  serão detalhados nos subitens 3.1.1 e 3.1.2 desta revisão.

O K é usualmente associado com o aumento do crescimento das plantas e da qualidade gustativa dos frutos e é prática comum entre produtores disponibilizar excessivamente este elemento para as plantas no intuito de obterem frutos mais saborosos. No entanto, o excesso de K no cultivo do morangueiro tem resultado em interações iónicas negativas com o Ca e com o magnésio (Mg) (Greenwood e Stone, 1998; Andriolo *et al.*, 2010).

De acordo com Marschner (2012), os catiões  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  competem entre si e com outros nutrientes pelos mesmos locais de absorção nas raízes, o que pode resultar numa nutrição desequilibrada das plantas. Segundo Jones Jr (2016), o excesso de fertilizantes potássicos na solução nutritiva reduz a absorção de Ca, uma vez que o K é preferencialmente absorvido e transportado na planta em relação ao Ca. Mondal *et al.* (2017) observaram em morangueiro que a baixa concentração de K na solução nutritiva levou a uma maior absorção de Ca e Mg e à acumulação destes elementos nas folhas, pelo facto do K em baixa concentração na solução nutritiva não competir com esses nutrientes no processo de absorção.

São diversas as composições de soluções nutritivas encontradas na literatura (Tabela 1), com valores de concentrações para o catião K que variam entre 2,2 e 7,5

mmol L<sup>-1</sup> e Ca entre 2,4 e 4,00 mmol L<sup>-1</sup>. No entanto, a dinâmica de absorção de nutrientes pelas plantas além de variar em função da concentração da solução e das relações iônicas, varia também em função do equilíbrio eletroquímico, oxigenação, temperatura do ar e da solução nutritiva e intensidade da radiação solar (Giménez *et al.*, 2008). Estes fatores exercem efeitos no crescimento, desenvolvimento e produtividade da cultura, sendo necessário o ajuste da concentração da solução nutritiva utilizada para as diferentes condições de produção (Tabela 1).

**Tabela 1.** Concentração de macronutrientes em soluções nutritivas para o cultivo do morangueiro.

Referência	Concentração (mmol L <sup>-1</sup> )						
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Morard (1984)	12,0	2,0	6,0	2,0	3,0	1,5	1,5
Muckle (1993)**	7,2	0,2	5,3	1,4	3,1	2,0	4,2
Sarooshi e Cresswell (1994)**	9,8	2,5	7,5	1,2	2,4	1,2	---
Sonneveld e Straver (1994)**	10,0	0,5	5,2	1,2	2,7	1,1	1,1
Hennion e Veschambre (1997)	12,0	2,0	6,0	2,2	3,0	1,3	1,0
Moraes e Furlani (1999)**	10,2	2,0	6,4	2,0	3,8	1,6	1,6
Paranjpe <i>et al.</i> (2003)**	4,0	0,7	2,2	1,6	2,4	1,6	1,7

\*citado por Resch (1992); \*\* citado por Giménez *et al.* (2008).

Embora as altas concentrações de K nos tecidos vegetais possa causar a redução do conteúdo de outros nutrientes nas plantas, é relatado por Marschner (2012) que o crescimento vegetativo pode aumentar sob esta condição. Contudo, o excesso de K tem se mostrado negativo para a produção e a qualidade de morangos (Andriolo *et al.*, 2010).

A perda na qualidade dos morangos não está relacionada unicamente com a concentração de K fornecida às plantas, mais também com o desequilíbrio gerado pelo excesso deste nutriente na relação K:Ca, como já foi mencionado. No entanto, mesmo em condições em que foram aumentadas as concentrações de K e Ca na solução nutritiva, foi observado por Khayyat *et al.* (2007) uma redução no peso e número de morangos e efeito negativo sobre a acidez titulável (AT), sólidos solúveis totais (SST), razão SST/AT e no teor em vitamina C em morangos da cv. Selva. O efeito do aumento da relação K:Ca foi também estudado por Hunsche *et al.* (2003) que associaram os valores elevados da relação K:Ca ao aumento de podridões em maçãs. Estes efeitos ocorreram devido ao desequilíbrio causado pelo excesso de cargas no meio de crescimento das plantas, porque a absorção de K, Ca e outros nutrientes com carga

positiva não depende somente da disponibilidade destes em torno das raízes, mas também da concentração destes na solução, pois há um limite para o somatório de cátions que podem ser absorvidos simultaneamente pela planta (Greenwood e Stone, 1998).

### **3.1 A influência do potássio nos mecanismos de transporte e acumulação de cálcio na célula vegetal**

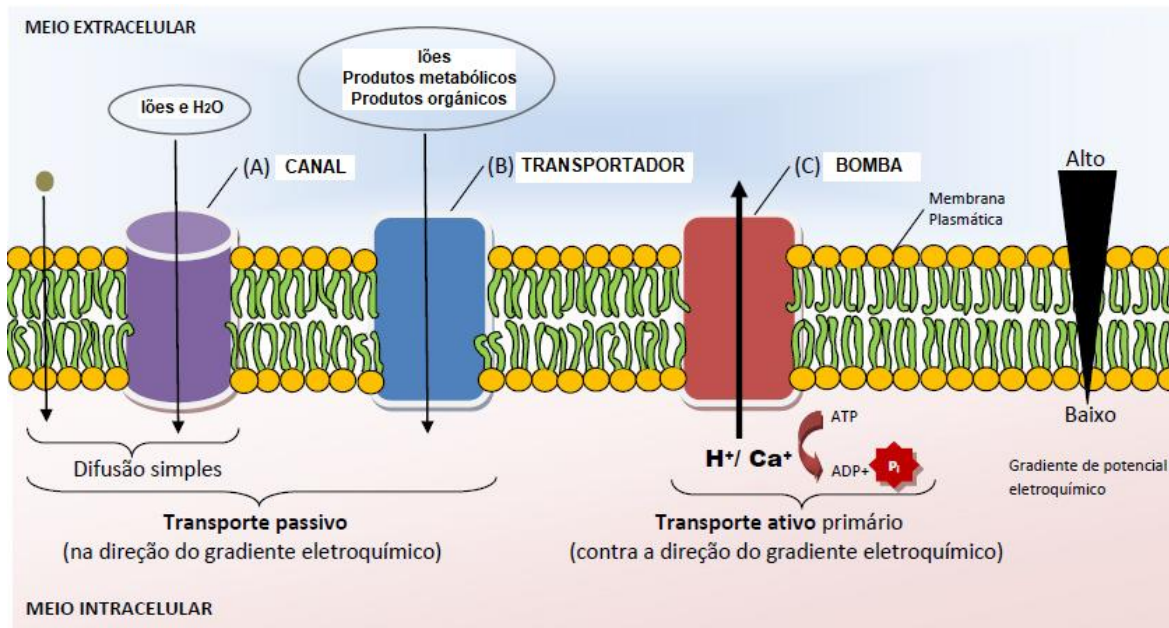
#### **3.1.1 Proteínas de transporte iônico entre membranas celulares**

A membrana plasmática é composta por uma bicamada fosfolipídica que envolve a célula vegetal separando-a da parede celular e do meio extracelular (Taiz e Zeiger, 2012). A função da membrana plasmática é regular constantemente a passagem de íons, água, metabolitos e outras substâncias para dentro e para fora da célula, permitindo que esta absorva, retenha e exclua o excedente e mantenha a sua turgidez (Epstein e Bloom, 2006).

O processo pelo qual a membrana plasmática permite ou restringe o movimento de uma substância entre o meio intracelular e extracelular é denominado permeabilidade. A permeabilidade depende das propriedades químicas do soluto e da composição lipídica da membrana, assim como das proteínas que efetuam o transporte de íons e água na membrana (Davies, 2013).

Poucas moléculas entram e saem da célula ou atravessam a membrana celular sem ajuda de proteínas de transporte específicas para os solutos que transportam, existindo por este motivo uma grande diversidade destas proteínas nas células. Na espécie *Arabidopsis thaliana*, aproximadamente 5 % do total de genes (849 genes), codificam proteínas envolvidas no transporte membranar (Taiz e Zeiger, 2012). Mesmo o transporte de moléculas como a água, que se pode difundir através das bicamadas de fosfolípidos é frequentemente acelerado por proteínas de transporte (Lodish *et al.*, 2000).

As proteínas de transporte são divididas em três classes principais: as que constituem os canais, as proteínas transportadoras e as que constituem os complexos proteicos conhecidos como bombas (Figura 1). As três classes de proteínas são transmembranares e apresentam um elevado nível de especificidade para a substância transportada. No entanto, a taxa de transporte destas três classes de proteínas difere consideravelmente entre si devido às diferenças no mecanismo de ação de cada uma (Lodish *et al.*, 2000).



**Figura 1.** Esquema representativo das três classes principais de proteínas de transporte localizadas na membrana plasmática das células vegetais: (A) canal, (B) transportadora e (C) bomba. Fonte: adaptado de Taiz e Zeiger (2012).

As proteínas classificadas como canais estão associadas a um transporte rápido, que ocorre por difusão simples ou facilitada, através da membrana plasmática, a favor do seu gradiente eletroquímico. As proteínas da classe das transportadoras (carregadoras) asseguram o movimento de água e uma grande variedade de íons e outras substâncias. Estas proteínas ligam-se à molécula a transportar de um lado da membrana e libertam-na do outro lado, seja para o meio intracelular ou extracelular (Taiz e Zeiger, 2012). Em contraste com as proteínas do tipo canal, as proteínas transportadoras ligam-se apenas a um (ou poucos) substrato de cada vez e após a ligação, esta proteína sofre uma mudança de conformação que impede a ligação a outros substratos. Assim, as proteínas transportadoras estão associadas a um tipo de transporte mais lento em comparação com o transporte que ocorre através dos canais (Lodish *et al.*, 2000).

As proteínas da classe das bombas, também descritas como bombas de ATP (adenosina trifosfato), são proteínas que catalisam o transporte ativo primário, transportando maioritariamente íons de  $H^+$  ou  $Ca^{2+}$  na membrana plasmática e no tonoplasto (Ramos *et al.*, 2011). Estas bombas são ATPases que utilizam a energia da hidrólise de ATP para mover íons ou moléculas pequenas através da membrana contra um gradiente de potencial eletroquímico (Lodish *et al.*, 2000).

### 3.1.2 O mecanismo de transporte de potássio e o influxo de cálcio em condições de deficiência de potássio

O K é o nutriente mais abundante nos tecidos das plantas constituindo cerca de 2 a 10 % da matéria seca vegetal (Leigh e Wyn Jones, 1984; Wang e Wu, 2013). A concentração de K no citoplasma é relativamente estável para a maioria das espécies vegetais, pois é controlada homeostaticamente. No entanto, podem ocorrer variações tanto no citoplasma quanto no vacúolo dependendo da concentração de  $K^+$  no meio de crescimento das plantas (Britto e Kronzucker, 2008). Os fluxos de  $K^+$  no citoplasma são catalisados por transportadores da membrana plasmática e tonoplasto, sendo a sua concentração mantida aproximadamente a 100 mM para promover o funcionamento ideal das enzimas que atuam ao nível celular (Walker *et al.*, 1996; Shabala e Pottosin, 2010). Em contraste, a concentração de  $K^+$  no vacúolo é dinâmica e pode variar entre 10 mM e 200 mM para manter a homeostase de  $K^+$  no citosol, pois este nutriente pode ser distribuído e reciclado entre os dois compartimentos celulares (White e Karley, 2010) ou variar em função da espécie vegetal, do tecido, e principalmente, da disponibilidade de  $K^+$  no meio de crescimento das plantas (Walker *et al.*, 1996; Marschner, 2012).

Comparado com a alta concentração de  $K^+$  no citosol e vacúolo das células, a concentração deste nutriente na superfície das raízes é baixa, podendo variar de 0,1 a 1 mM (Maathuis, 2009). As células da raiz absorvem o  $K^+$  do meio contra o gradiente de concentração, num processo conduzido pelas proteínas do transporte de  $K^+$  na planta, que posteriormente fazem a translocação deste nutriente das raízes para os outros órgãos e tecidos vegetais (Wang e Wu, 2013).

O transporte do  $K^+$  pode ser realizado através de proteínas do tipo canais retificadores internos, canais retificadores externos e por transportadores de alta afinidade. As primeiras, permitem a passagem unidirecional do  $K^+$  do meio extracelular para compartimentos celulares limitados pela membrana; as segundas, permitem o fluxo unidirecional do  $K^+$  para fora dos compartimentos celulares; e as terceiras, também conhecidos como bomba de sódio ( $Na^+$ ) e  $K^+$ , permitem a troca do ião  $Na^+$  intracelular por  $K^+$  extracelular (Epstein e Bloom, 2006).

A identificação e caracterização dos diversos canais de  $K^+$  nos órgãos e tecidos vegetais foi previamente descrita em *A. thaliana*, sendo estes classificados em cinco famílias: *Shaker* (incluindo os canais AKT1, AtKC1, SPIK, AKT2, KAT1, KAT2, SKOR e GORK), TPK (incluindo os canais TPK1 e TPK4), KUP/HAK/KT (incluindo os canais KUP1, KUP2, KUP4 e HAK5), NHX (incluindo os canais NHX1 e NHX2) e CHX (incluindo os canais CHX13, CHX17, CHX20, CHX21 e CHX23) (Wang e Wu, 2013).



Quando ocorrem flutuações na concentração de  $K^+$  disponível no meio de crescimento da planta, nomeadamente no que diz respeito a uma diminuição da disponibilidade, esta condição é percebida pela membrana plasmática das células epidérmicas das raízes, as quais geram um sinal que é posteriormente transmitido ao citoplasma. Após perceber o sinal, as células passam por uma série de reações bioquímicas e fisiológicas que incluem respostas a curto e longo prazo (Schachtman e Shin, 2007). As respostas de curto prazo ocorrem em poucas horas e envolvem uma alteração do potencial da membrana, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, *oxygen-reactive species*) e síntese de reguladores de crescimento (Shin e Schachtman, 2004).

Inicialmente, mesmo que a concentração de  $K^+$  no meio de crescimento das plantas seja baixa, a concentração de  $K^+$  nos compartimentos celulares pode não ser afetada (Schachtman e Shin, 2007). No entanto, caso essa condição permaneça por vários dias, a concentração deste nutriente será então significativamente reduzida no interior das células das plantas e será iniciada uma resposta (resposta de longo prazo) a esta condição de *stress* (Schachtman e Shin, 2007). Essa resposta pode passar por alterações metabólicas (Amtmann *et al.*, 2008) e morfológicas (Hodge, 2004), nomeadamente o aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  no interior das células, induzido pela hiperpolarização da membrana plasmática e pela acidificação extracelular (Wang 2003).

A hiperpolarização da membrana plasmática aumenta o potencial das membranas das células vegetais e é a principal força motriz que favorece a absorção de  $Ca^{2+}$  do meio de crescimento das plantas contra o gradiente de concentração de  $Ca^{2+}$  na raiz (Wang, 2013). O potencial de membrana é dependente da concentração de  $K^+$  do meio e é estabelecido e mantido principalmente pela atividade das bombas do tipo  $H^+$ -ATPase (Palmgren, 2001). O potencial de membrana é hiperpolarizado quando a concentração de  $K^+$  do meio é baixa (Nieves-Cordones *et al.*, 2008) e despolarizado quando a concentração de  $K^+$  do meio é elevada (Spalding *et al.*, 1999), podendo a alteração do potencial de membrana atuar como um dos sinais para induzir uma resposta das plantas a este *stress* abiótico (deficiência de K).

As bombas de prótons ATPases ( $H^+$ -ATPases) são as principais contribuintes que geram não apenas o potencial da membrana, mas também a acidificação extracelular e o gradiente de prótons transmembranares (Palmgren, 2001). A deficiência de  $K^+$  aumenta a atividade destas bombas, levando à libertação de  $H^+$ , que resulta na acidificação extracelular (Wang e Wu, 2013) e conseqüentemente, na hiperpolarização da membrana.

Muitos canais de catiões não seletivos são ativados sob o potencial de membrana hiperpolarizado e são, portanto, chamados canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por hiperpolarização (Demidchik e Maathuis, 2007; Wang e Wu, 2013). Em *A. thaliana*, os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  estão envolvidos na absorção de  $\text{K}^+$ , especialmente sob condições de deficiência de K, o que sugere que as células vegetais podem exigir uma sinalização específica do Ca para sinalizar a deficiência de K (Li *et al.*, 2006). O efeito do aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induzido pela baixa concentração de  $\text{K}^+$  no meio foi relatada em células-guarda estomáticas por Allen *et al.* (2001).

O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  pode posteriormente gerar um sinal específico para o *stress* ocasionado pela deficiência de K e o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático podendo ativar ainda os canais de catiões não seletivos da endomembrana e levar à liberação de mais  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Wang e Wu, 2013).

Acredita-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  entra no citoplasma das células vegetais através de canais permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  localizados na banda Caspari no córtex das raízes e que este é bombeado a partir do simplasto para a membrana plasmática através de proteínas cálcio ATPases (Ca-ATPases) ou proteínas permutadoras de catiões e protões (*antiporters* CAXs) e que possa ser entregue gradualmente ao xilema (White e Broadley, 2003).

A atuação de outras bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , como as  $\text{H}^+$ -ATPases vacuolares (V-ATPases) e pirofosfatases ( $\text{H}^+$ -PPases), localizadas no tonoplasto, também desempenham um papel importante na condução da acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células. Estas proteínas contribuem para o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana do tonoplasto, gerando um potencial eletroquímico que serve para impulsionar a absorção de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas CAXs, permitindo aumentar o movimento do  $\text{Ca}^{2+}$  para o vacúolo (White e Broadley, 2003; De Freitas *et al.*, 2013).

#### **4. A importância do potássio na fisiologia do morangueiro**

O K desempenha importantes funções na fisiologia das plantas em geral. Apesar não ser constituinte estrutural da célula vegetal ou de moléculas orgânicas, este elemento está envolvido em numerosos processos bioquímicos e fisiológicos vitais para o crescimento vegetativo, produção e qualidade dos frutos (Cakmak, 2005; Marschner, 2012).

As plantas dependem de K para regular a abertura e o fechamento dos estomas, o que é essencial para a fotossíntese, para o transporte de água e nutrientes e para o arrefecimento das plantas (Mengel, 2007). Quando o K se move nas células-guarda

estomáticas, estas acumulam água por osmose e aumentam de volume (Langer *et al.*, 2004). Este aumento de volume das células faz com que os estomas se abram, facilitando assim as trocas gasosas. Quando os estomas estão abertos, ocorre a troca de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), vapor de água e oxigênio entre a planta e a atmosfera (Taiz e Zeiger, 2012). Os estomas fecham-se para evitar a perda de água da planta quando não há fornecimento de água suficiente e abrem-se para permitir que os gases se movam de dentro para fora da planta (Epstein e Bloom, 2006).

Quando o suprimento K é inadequado, o estímulo para abertura e fecho estomático torna-se lento, pois os estomas não conseguem reagir rapidamente à falta do K e podem levar horas em vez de minutos para fechar e abrir, causando a perda excessiva de água e tornando as plantas mais suscetíveis ao *stress* hídrico (Lisar *et al.*, 2012). Plantas sob *stress* hídrico tendem a enrolar as folhas, reduzindo a área superficial e, conseqüentemente, reduzindo a fotossíntese (Okada *et al.*, 1992).

A fotossíntese é um processo complexo no qual as plantas utilizam a luz solar, o CO<sub>2</sub> atmosférico e a água para sintetizar compostos orgânicos carbonados que são armazenados nas células para posterior produção de compostos energéticos, como açúcares e ATP (Taiz e Zeiger, 2012).

O morangueiro é uma planta com a via metabólica C3 para fixação do CO<sub>2</sub>. Plantas com este tipo de via metabólica, em condições de alta disponibilidade de CO<sub>2</sub>, tem a capacidade de maximizar a eficiência fotossintética, sendo esta determinada basicamente pelo aumento da atividade carboxilásica da enzima Rubisco (RuBP – Ribulose-1,5-bifosfato) e pela sua capacidade regenerativa. Pelo contrário, o aumento de temperatura nas plantas C3 provoca uma diminuição da taxa fotossintética por diminuição da atividade carboxilásica da Rubisco e conseqüente aumento da sua atividade oxigenásica. O aumento da atividade oxigenásica da Rubisco leva a um aumento da fotorrespiração e, conseqüentemente, a uma diminuição da fotossíntese líquida (Taiz e Zeiger, 2012).

A absorção da luz ocorre nos aparatos fotossintéticos pela ação de pigmentos específicos, as clorofilas (Casierra-Posada e Peña-Olmos, 2015). A luz absorvida pode comportar-se como partícula, carregando energia (fotão) passível de absorção pelos vegetais e também como onda eletromagnética. Esta energia só é útil quando é absorvida; caso contrário é perdida sob a forma de calor ou fluorescência (Taiz e Zeiger, 2012).

As clorofilas participam nesta absorção e captação de energia luminosa para posterior conversão em ATP e poder redutor, os quais podem ser usados na síntese dos hidratos de carbono. Desse modo, a presença destes pigmentos vai condicionar a

atividade fotossintética das plantas e, conseqüentemente, a produção de energia para a síntese de compostos envolvidos em mecanismos de defesa contra *stress* bióticos e abióticos pela planta (Taiz e Zeiger, 2012).

O K atua como catalisador, ativando enzimas envolvidas na regulação da taxa de fotossíntese e na produção de ATP. Durante a produção de ATP, a planta usa íons de K para regular o equilíbrio elétrico ao nível da célula, o que é importante para maximizar a produção destas moléculas de alta energia (Taiz e Zeiger, 2012). Este é provavelmente o papel mais crítico do K para o funcionamento normal da planta, porque quando as plantas estão deficientes em K, a produção de radicais livres pode aumentar e causar distúrbios no mecanismo de abertura e fechamento dos estomas, o que reduz a fotossíntese e, conseqüentemente, a produção de ATP, fazendo com que todos os processos dependentes desta molécula sejam mais lentos. Este facto limita posteriormente todos os aspetos do desenvolvimento e crescimento da planta, além de causar excesso de eletrões, os quais são desviados para a produção de ROS (Cakmak, 2005).

Após a produção de açúcares na fotossíntese, ocorre o transporte dos mesmos através do floema para utilização e armazenamento noutras partes da planta. Parte deste transporte é efetuado com consumo de energia (ATP). Quando os níveis de K na planta são inadequados, menos ATP é produzido e o sistema de transporte diminui, estes açúcares acumulam-se nas folhas e o desenvolvimento da planta pode ser significativamente reduzido (Taiz e Zeiger, 2012).

Além da participação nos processos fotossintéticos, o K também desempenha um papel importante no transporte de água e nutrientes em toda a planta através do xilema. Tal como acontece com os sistemas de transporte do floema, o papel de K no transporte do xilema ocorre muitas vezes em conjunto com enzimas específicas e hormonas de crescimento das plantas (Raven *et al.*, 2005). Quando o fornecimento de K é reduzido, a translocação de nitratos, fosfatos, cálcio, magnésio e aminoácidos através do xilema ficam comprometidas (Raven *et al.*, 2005; Wang e Wu, 2013).

O fornecimento adequado de K pode aumentar a acumulação de biomassa seca total nas plantas (Lindhauer, 1985; Egilla *et al.*, 2001). Esse efeito pode ser atribuído à atuação do K na eficiente regulação estomática associada com às altas taxas fotossintéticas (Marschner, 2012), bem como ao papel essencial do K na translocação de fotoassimilados no crescimento das raízes (Römheld e Kirkby, 2010). Níveis adequados de K contribuem também para o aumento da área foliar e da matéria fresca total da planta, pela melhor retenção de água nos tecidos vegetais (Wang *et al.*, 2013).

O K também é um nutriente importante para a melhoria da qualidade dos frutos. Estudos indicaram que a aplicação de K proporcionou maior peso, calibre e produção de frutos, aumento no teor de sólidos solúveis totais e concentração de ácido ascórbico, intensificação da cor e alongamento do tempo de conservação pós-colheita (Chitarra e Chitarra, 2005; Neilsen e Neilsen, 2011; Mimoun e Marchand, 2013).

## **5. A importância do cálcio na qualidade e conservação dos frutos**

### **5.1 O cálcio e a parede celular**

O Ca desempenha diversas funções fisiológicas fundamentais na planta, principalmente nos processos relacionados com as alterações na composição química e física dos frutos (Belge *et al.*, 2017). Este nutriente promove também o desenvolvimento e a expansão dos tecidos vegetais por estar envolvido no mecanismo de regulação que dá origem à parede celular, além de ser um constituinte estrutural importante deste tecido, responsável por manter a sua resistência (Hepler e Winship, 2010).

A célula vegetal das plantas superiores possui parede celular primária, por vezes, secundária e uma lamela média, rica em pectato de cálcio. A parede primária é formada na fase de crescimento dos tecidos e a parede secundária forma-se em alguns tecidos das plantas após cessar o desenvolvimento celular. Destas camadas que constituem a parede celular, a lamela média é a camada mais externa e pode ser considerada a extensão da matriz da parede primária, desempenhando a função de adesão intercelular. De acordo com Selvendran e O'Neill (2006), a parede das células vegetais é formada por componentes miofibrilares e matriciais. A fase miofibrilar caracteriza-se por um elevado grau de cristalização e é composta por microfibrilas de celulose que se apresentam como estruturas extremamente longas e finas. A fase matricial é composta por material hidrofílico designado por polissacarídeos pécticos e polissacarídeos hemicelulósicos. Podem ainda surgir associadas à parede celular, glicoproteínas ou proteínas estruturais. As proporções médias destes elementos na parede celular de dicotiledóneas foram definidas por Fry (2001), sendo aproximadamente 30 % de celulose, 30 % de hemicelulose, 35 % polissacarídeos e 5 % de glicoproteína, podendo haver variações na parede celular dos frutos com uma maior proporção em pectinas e menor proporção de conteúdo proteico (Payasi *et al.*, 2009).

Os polissacarídeos da matriz constituem a fração da parede celular que apresenta maiores diferenças de composição entre espécies vegetais. Nas dicotiledóneas e algumas monocotiledóneas os principais polissacarídeos das paredes celulares são as pectinas e as xiloglucanas (Carpita e Gibeaut, 1993).

Os polissacarídeos pécticos são os principais componentes químicos da lamela média e são habitualmente extraídos com água quente ou soluções de agentes quelantes. Nos frutos de dicotiledóneas os polissacarídeos pécticos são formados por cadeias de resíduos de ácido galacturónico e ramnose. Estes polissacarídeos são altamente ramificados por cadeia laterais ricas em arabinose e galactose, gelificam na presença de iões e na lamela média encontram-se associados por pontes de cálcio (Mangas *et al.*, 1992). Grande parte dos resíduos de ácido galacturónico encontram-se esterificados com metanol, assumindo assim a designação mais comum de pectinas, sendo que graus mais elevados de esterificação dos polissacarídeos pécticos determinam menor capacidade destes formarem ligações com o cálcio (Mangas *et al.*, 1992).

Essas ligações com o cálcio formam o pectato de cálcio, que é um composto insolúvel predominante nos frutos imaturos. Este composto dificulta o acesso e a ação de enzimas degradativas, tais como as poligalacturonases, produzidas durante o processo de maturação dos frutos e da ação das enzimas produzidas por fungos e bactérias que causam a deterioração dos tecidos (Marschner, 2012).

Devido a esta função estrutural do cálcio na parede celular, este catião está diretamente relacionado com o retardar da senescência dos frutos e com a maior resistência destes frutos aos danos de natureza fisiológica, microbiana e mecânica (Chitarra e Chitarra, 2005).

O  $\text{Ca}^{2+}$  é um ião que atua também como agente de sinalização em interações que ocorrem na parede celular e nas respostas das plantas ao *stress* (Dodd *et al.*, 2010; Hepler e Winship, 2010; Kudla *et al.*, 2010; Gilliam *et al.*, 2011). As mudanças químicas que ocorrem na parede celular dos frutos durante o desenvolvimento e maturação, incluem a modificação das cadeias laterais da pectina e a sua despolimerização; e a degradação da celulose e das hemiceluloses. Para além destes processos, ocorre também durante a maturação, o aumento da atividade de proteínas não catalíticas, bem como a acumulação de solutos (Hocking *et al.*, 2016). As alterações físicas dos frutos verificadas durante a maturação estão associadas às modificações e solubilização continua dos polissacarídeos pécticos.

## 5.2 O cálcio e o amolecimento dos frutos

As alterações na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no apoplasto da célula e as modificações que ocorrem nos compostos pécticos são importantes para o desenvolvimento físico dos frutos. A gelificação das pectinas pode ocorrer por alterações do pH do apoplasto ou pela presença de iões, como o  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta propriedade das pectinas confere aos frutos alterações nas propriedades mecânicas, incluindo na resistência à compressão, na capacidade de retenção de água, na porosidade e na elasticidade (Tibbits *et al.*, 1998; Ngouémazong *et al.*, 2012). A força de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à pectina depende do pH, sendo que as ligações mais fortes se formam com o pH apoplástico entre 6 e 7 (Hocking *et al.*, 2016).

A formação dos géis de pectina envolve a ligação dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  aos grupos carboxílicos não esterificados ( $\text{COO}^-$ ). Tanto a formação quanto a dissolução destes géis é altamente dependente do nível de esterificação das pectinas e da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no apoplasto (Tibbits *et al.*, 1998). A hidratação do gel pode ser observada durante a dissolução da parede celular e à medida que ocorre a hidratação e a dissolução do gel, ocorre também a saída dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  dos polissacarídeos da lamela média, reduzindo a resistência e a estabilidade do gel (Tibbits *et al.*, 1998). Segundo Zsivanovits *et al.* (2004), o estado de hidratação da pectina tem uma relação inversa com a sua resistência; e a suscetibilidade da matriz de pectina à hidratação é determinada tanto pela composição da mesma quanto pela composição iónica do meio envolvente (Zsivanovits *et al.*, 2004).

O processo de amolecimento dos frutos é atribuído a estas alterações que ocorrem na composição da parede celular, particularmente ao nível da hidratação dos géis de pectina, que resulta na perda de resistência e elasticidade dos frutos. No caso dos morangos, a retenção de água na parede celular ocorre durante o amadurecimento, o que resulta num fruto com textura macia (Redgwell *et al.*, 1997).

A acumulação e a distribuição do cálcio no fruto são altamente dependentes das vias físicas e moleculares de circulação da água e do impacto que a sinalização do cálcio pode ter nas interações da parede celular, nomeadamente na regulação do  $\text{Ca}^{2+}$  entre o citoplasma e a parede (Hocking *et al.*, 2016). Os fatores que influenciam a distribuição e a acumulação do cálcio nos frutos incluem: o fluxo de água no xilema, através do processo de transpiração (o  $\text{Ca}^{2+}$  apresenta falta de mobilidade no floema); a competição entre iões pelos sítios de ligação nas paredes dos vasos do xilema; a formação de complexos pouco solúveis ou insolúveis (como carbonato, sulfato, fosfato, silicato, citrato, malato e oxalato); e os mecanismos celulares de transporte de água

(Franceschi e Nakata, 2005; Saure, 2005; Gilliam *et al.*, 2011). No caso dos frutos, que possuem baixas taxas de transpiração e conseqüentemente, baixas taxas de transporte no xilema quando comparados com o resto da planta, a distribuição do cálcio torna-se mais limitada.

Concentrações elevadas de Ca nos tecidos pode resultar em toxicidade para as células, em paredes celulares excessivamente rígidas e em anomalias no desenvolvimento dos frutos (Cybulska *et al.*, 2011). Quando a concentração de Ca é baixa, ocorrem deficiências locais deste elemento originando a necrose dos tecidos ou podendo ocasionar a ruptura da parede celular.

## **6. A utilização da espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) para avaliação do teor de nutrientes em tecidos vegetais**

Desde que os conceitos de nutrição vegetal foram fundados, muitos esforços têm sido colocados no desenvolvimento de métodos para diagnosticar distúrbios, deficiências e excessos nutricionais nas culturas. Atualmente, a utilização de tecnologias alternativas aos métodos tradicionais de determinação dos teores de nutrientes nos tecidos vegetais, tem ganho cada vez mais espaço na ciência e na indústria por apresentarem uma série de vantagens, entre elas, a velocidade de execução associada à alta precisão.

A espectroscopia do infravermelho próximo tem sido considerada uma das tecnologias mais avançadas para a determinação do teor em nutrientes de forma não destrutiva em produtos de origem vegetal. Caracteriza-se por ser uma técnica de execução rápida, não gerar subprodutos tóxicos, exigir apenas uma preparação simplificada das amostras e apresentar um baixo nível de impacto ambiental (Manley, 2014). Alguns trabalhos recentes que utilizam a espectroscopia do infravermelho próximo para avaliação do teor em macro e micronutrientes em produtos de origem vegetal podem ser consultados na Tabela 2.



**Tabela 2.** Trabalhos envolvendo a utilização do NIR para determinação do teor de macro e micronutrientes em diferentes materiais de origem vegetal.

Espécie	Material vegetal	Nutrientes	Referência
Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	Grãos	P	Ferrarini (2004)
Uva ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	Vinho	Ca, K, Mg, P, S, Na, Fe, B, Mn	Cozzolino <i>et al.</i> (2008)
Laranja ( <i>Citrus sinensis</i> L.)	Folhas	N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn	Menesatti <i>et al.</i> (2010)
Cevada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	Folhas	Cu	Van Maarschalkerweerd <i>et al.</i> (2013)
Chá Mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> )	Folhas	N, P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Mn, Cu	Rossa <i>et al.</i> (2015)
Batata ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	Tubérculos	N	López (2016)

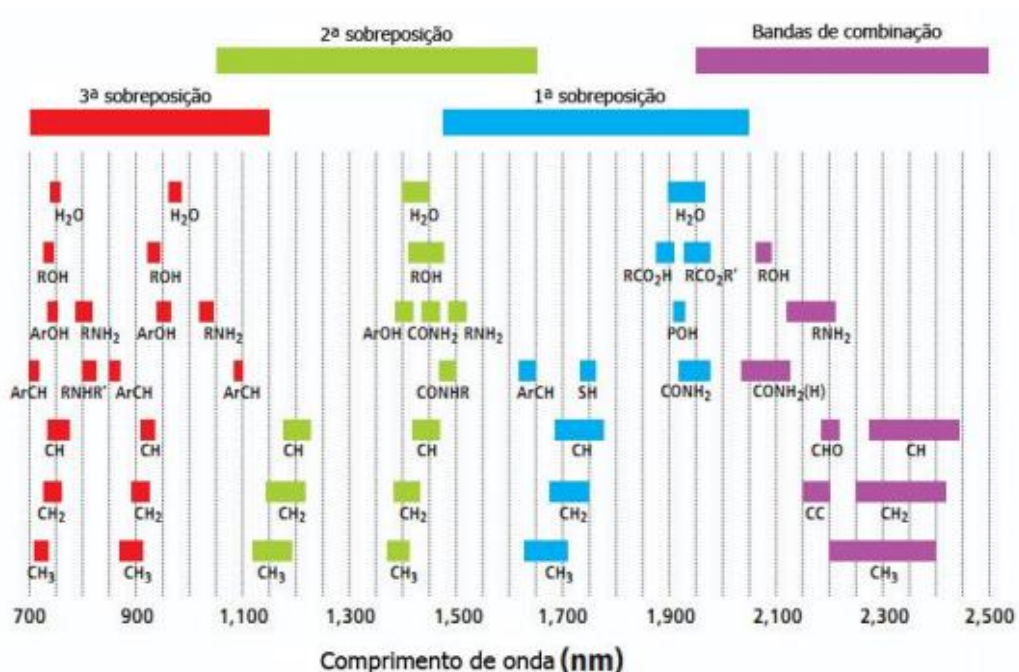
### 6.1 Descrição da tecnologia

Os espectros do infravermelho são divididos em três regiões: infravermelho próximo (NIR, *near infrared*), médio (MID, *middle Infrared*) e distante (FAR, *far Infrared*). No conjunto destas regiões, o emprego da espectroscopia no infravermelho, para determinação dos componentes de alimentos, está quase que exclusivamente relacionada com o infravermelho próximo.

A radiação NIR (800 – 2500 nm, respectivamente 12000 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) cobre a transição da faixa espectral visível para a região do infravermelho médio (2500 – 5000 nm, respectivamente 4000 – 200  $\text{cm}^{-1}$ ) (Lodder, 2002). A interação da radiação eletromagnética com a matéria permite, através da determinação dos níveis de energia emitidos pelos átomos e moléculas do analito, a quantificação de muitas espécies moleculares orgânicas e inorgânicas em diferentes tipos de amostras. A incidência da radiação infravermelha numa amostra pode levar à transição entre estados energéticos das suas moléculas constituintes, de acordo com a intensidade da radiação incidente. Assim, a base para a espectroscopia no infravermelho é a vibração molecular.

Na área espectral do NIR, representada na Figura 2, observa-se que a luz incidente interage principalmente com moléculas dos grupos orgânicos, como  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$  ou  $\text{H}_2\text{O}$ , que vibram quando expostas à radiação NIR e esta frequência de vibrações moleculares depende da força das ligações químicas e da massa de cada átomo envolvido (Van Maarschalkerweerd e Husted, 2015). A radiação NIR incidente numa amostra é absorvida nas frequências correspondentes às das vibrações moleculares e o restante é refletido ou transmitido (Osborne *et al.*, 1993; Pavia *et al.*,

2008). Assim, um espectro NIR é a representação gráfica do comprimento de onda da radiação absorvida e todas as bandas de absorção formadas são resultado da combinação de tons, sobretons (sobreposições) e de bandas de combinação de grupos fundamentais contendo as ligações acima referidas (Siesler *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Sobretons (sobreposições) e combinação de bandas na área espectral do NIR. Fonte: Adaptado de Xiaobo *et al.* (2010).

Na análise nutricional das plantas, a espectroscopia NIR pode ser utilizada como uma análise elementar rápida e precisa, se existir no analito uma correlação consistente entre um nutriente mineral e um composto espectroscopicamente ativo (grupos orgânicos) (Van Maarschalkerweerd e Husted, 2015). O nutriente mineral pode formar parte deste composto ou ser essencial na sua biossíntese. No entanto, segundo Huang *et al.* (2009) as moléculas presentes em baixas concentrações não serão detetáveis ou poderão comprometer a obtenção de uma relação linear entre a concentração do nutriente e os dados espectroscópicos, devido à indução de outros tipos de reações.

O interesse pela utilização da espectroscopia NIR por investigadores e empresas aumentou graças à melhoria e desenvolvimento de novos instrumentos e à utilização de novos métodos matemáticos, nomeadamente a análise multivariada. Este tipo de análise, permite o tratamento de grande volume de dados para construção dos modelos de calibração, uma vez que os espectros NIR obtidos são de difícil interpretação por gerarem um volume muito grande de dados (Roggo *et al.*, 2007). A combinação da espectroscopia com transformada de *Fourier* e técnicas multivariadas, como as

regressões de mínimos quadrados parciais (PLSR, *partial least-squares regression*), fornece uma poderosa ferramenta para interpretação de espectros. A análise de dados quimiométricos é, portanto, necessária para extrair as informações sobre as variáveis que estão no espectro do infravermelho próximo da amostra (Singh *et al.*, 2011).

A espectroscopia NIR é considerada por alguns autores como apresentando resultados mais reprodutíveis que os métodos analíticos convencionais (Manley, 2014) e tem sido utilizada para determinar os teores da maioria dos nutrientes essenciais às plantas em várias espécies vegetais tal como consta na Tabela 2.

Um equipamento com espectroscopia NIR é constituído, em geral, por 4 componentes principais: uma fonte de radiação, um dispositivo para a seleção de comprimento de onda, um transdutor de sinal (que é um detetor fotoelétrico para medir a intensidade da luz e convertê-la em sinais elétricos) e um sistema para adquirir e processar os dados espectrais (Lin *et al.*, 2009). A radiação que é produzida pela fonte é conduzida para o dispositivo onde ocorre a repartição do feixe nos seus diferentes comprimentos de onda, ao incidirem na amostra vão produzir uma interferência que é captada no detetor, sendo gerado um interferograma. Atualmente os principais instrumentos utilizados para medições na região do NIR são os espectrómetros baseados na transformada de *Fourier* (FT-NIR). A transformada de *Fourier* é uma função matemática que aplicada ao interferograma permite a sua conversão numa curva de energia permitindo uma mais fácil interpretação dos espectros.

## **6.2 Utilização da análise multivariada para obtenção de modelos**

Para a obtenção de um modelo que permita prever o valor do parâmetro de interesse a partir de uma amostra é necessário obter valores de referência do parâmetro em causa, pelo que se torna necessário recorrer aos métodos convencionais de análise (Coates, 1999). A obtenção destes modelos pressupõe uma validação do próprio modelo, pelo que é habitual a utilização de dois conjuntos de amostras do material em estudo. Um conjunto de amostras de onde se obtêm os espectros utilizados para a calibração e o outro conjunto (habitualmente representará 1/3 do primeiro conjunto) serve para a validação externa, permitindo assim avaliar a capacidade do modelo para prever os resultados obtidos a partir de amostras desconhecidas. O conjunto de amostras de calibração e de validação são independentes e devem consistir em amostras distintas (Roggo *et al.*, 2007). Estas duas etapas são importantes na calibração multivariada: a construção do modelo (calibração) e a validação ou previsão deste modelo, ou seja, se o modelo construído é realístico ou não.

Na etapa de calibração, são obtidas matrizes com as respostas instrumentais ( $X$ ) e com os resultados das concentrações obtidos pelos métodos analíticos de referência ( $Y$ ). Os dados assim organizados constituem o conjunto de calibração. Diante disto, cria-se um modelo matemático adequado que possa melhor reproduzir  $Y$  a partir dos dados de  $X$ , utilizando para isso uma função do tipo ( $Y = f(X) = Xb$ ). O cálculo do coeficiente  $b$  permite a obtenção do valor do analito em estudo a partir dos respectivos espectros. O PLSR é um exemplo de método de análise de regressão que permite obter um modelo de calibração, capaz de estabelecer a relação entre um grande número de variáveis ( $X$ ) extremamente complexas, como os espectros NIR, com variáveis de menor dimensão ( $Y$ ), tais como concentrações de nutrientes (Rodríguez-Saona *et al.*, 2001). O PLSR é considerado um método eficiente principalmente por ser capaz de superar erros experimentais, tais como a colinearidade e a não linearidade (Oliveira, 2014). Para alguns autores a utilização do PLSR resulta em modelos de calibração mais próximos da realidade e conseqüentemente, reproduzíveis (Williams e Norris, 1987).

Antes da construção dos modelos de calibração e da validação, devem ser aplicadas técnicas de pré-tratamentos aos espectros para evitar a influência de efeitos indesejáveis, tais como a deformação da linha de base, variações no caminho ótico, ruído e dispersão de luz, que podem afetar negativamente a eficiência e a confiabilidade dos modelos multivariados (Barbin *et al.*, 2012). Entre os vários pré-tratamentos desenvolvidos, encontra-se a normalização (SNV – *standard normal variate transformation*) e a derivação.

A SNV é uma técnica capaz de reduzir os efeitos da dispersão da luz nos espectros obtidos (Rinnan *et al.*, 2009). É um método de normalização espectral, que estabelece uma escala comum para todos os espectros, centrando cada um no seu valor médio e ampliando-o pelo seu desvio padrão (Morgano, 2005). Desta forma, a aplicação da SNV corrige a variação aditiva e multiplicativa entre os espectros.

A derivação faz a compensação do aumento da linha de base e melhora a separação de sinais não totalmente sobrepostos, realçando-os. Para este cálculo é utilizado o algoritmo de Savitzky-Golay, que executa simultaneamente um alisamento espectral (Savitzky e Golay, 1964). Tanto a primeira como a segunda derivada removem o deslocamento da linha de base nos dados, enquanto a segunda derivada também é útil para separar os picos sobrepostos (Burger e Geladi, 2007).

Após o pré-tratamento dos espectros e a aplicação de métodos de análise multivariada, a avaliação da calibração e validação do modelo pode ser realizada através da análise dos erros RMSEP (Raiz quadrada do erro de predição, *root mean square error of the prediction*) e RMSECV (Raiz quadrada da soma dos erros da

validação cruzada, *root mean square error of the cross validation*) respetivamente. Através do parâmetro RMSEP a capacidade de previsão do modelo é avaliada, desde que haja número de amostras suficiente, a partir de uma série de amostras de referência que não participaram no desenvolvimento do modelo (validação externa), de composição diferente das amostras que fizeram parte com do conjunto de calibração inicial (Martens e Naes, 1984). Através do parâmetro RMSECV, a validação do modelo é feita com base num conjunto de amostras retiradas do conjunto daquelas que não participaram do modelo de calibração. Além da análise desses parâmetros estatísticos, que auxiliam na escolha dos modelos de calibração, existe também a análise dos valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ). Quanto mais próximo este parâmetro estiver de 1, é melhor o ajuste ou a capacidade de previsão do modelo de regressão (Morgano, 2005). De facto, quanto maior o valor de  $R^2$  e quanto menor os valores dos erros das etapas de calibração e validação, melhores são os resultados obtidos pelos modelos.

O modelo de validação pode ser avaliado qualitativamente e para tal utilizam-se parâmetros específicos tais como o desvio residual da predição (RPD - *residual predictive deviation*) e o número de BIAS (tendência ou viés). O número de BIAS representa a média dos desvios entre os valores de referência e os valores previstos (Amodio *et al.*, 2017). O valor de BIAS e da inclinação da reta são outros critérios utilizados para avaliar o modelo de validação dos parâmetros em estudo. O valor de BIAS ideal não deve exceder 0,6 e a inclinação mínima (slope) para um modelo satisfatório deve ser 0,90 (Sánchez *et al.*, 2011; Amodio *et al.*, 2017). O valor de RPD corresponde à razão entre o desvio padrão dos valores de referência da variável de resposta e o erro médio previsto da validação, representando assim a qualidade dos resultados da validação. Relaciona assim o desempenho da calibração com o intervalo de medidas e é frequentemente usado como um indicador de qualidade da calibração. Quanto mais elevado for o valor de RPD melhor é o modelo de calibração. (Ward *et al.*, 2011; Williams, 2014).



## Capítulo II

---





## Efeito de diferentes doses de potássio na fisiologia do morangueiro, na acumulação de K, Ca e Mg, na produção e qualidade de morangos

---

### 1. Introdução

O cultivo hidropônico tem ganhado cada vez mais popularidade na produção comercial de morangos (Treffz *et al.*, 2015a; Treffz e Omaye, 2015b; Choi *et al.*, 2016; Diel *et al.*, 2017; Murthy *et al.*, 2017). Atualmente existem inúmeros tipos de sistemas hidropônicos amplamente utilizados no cultivo do morangueiro, podendo estes ser suspensos ou colocados sobre suportes, com ou sem circulação da solução nutritiva e podem utilizar diversos substratos para o crescimento das plantas, tais como turfa, areia, cascalho, espuma de poliuretano, poliestireno expandido, perlite, lã de rocha, vermiculita, casca de pinheiro, fibra de coco, etc. (Recamales *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2017).

O cultivo sem solo em sistemas hidropônicos foi desenvolvido para otimizar o rendimento da cultura, a qualidade dos frutos e reduzir os problemas fitossanitários das plantas (Recamales *et al.*, 2007). Uma das grandes vantagens em produzir nestes sistemas é a facilidade de manejo dos nutrientes, pois permite um maior controle sobre a zona radicular comparado com o cultivo no solo, o que facilita a gestão dos nutrientes com base nas necessidades nutricionais da cultura.

No manejo da solução nutritiva, além da composição nutricional, é fundamental ter em consideração as interações existentes entre os nutrientes. De facto, uma solução equilibrada é um fator determinante para o crescimento e desenvolvimento vegetativo das plantas, refletindo-se numa produção de frutos com elevada qualidade e valor nutricional.

A fertilização potássica e os seus efeitos positivos sobre as características morfológicas e fisiológicas dos morangueiros têm sido amplamente estudados (Lieten, 2006; Andriolo *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2014; Yaghubi *et al.*, 2016; Mondal *et al.*, 2017). O K participa no metabolismo dos hidratos de carbono, influenciando diretamente a produtividade do morangueiro, além de estar envolvido na manutenção da turgescência das folhas, razão pela qual este elemento é essencial no transporte interno de fotoassimilados e no equilíbrio eletroquímico das células (Andriolo *et al.*, 2010).

A deficiência deste catião está relacionada com a redução da condutância estomática, prejudicando assim a fixação de CO<sub>2</sub>, o que interrompe a conversão de energia luminosa em energia química no processo fotossintético da folha (Cakmak, 2005); já o excesso deste elemento pode comprometer a absorção de outros catiões

(Marschner, 2012). No que diz respeito aos frutos, o K é o elemento mais associado à qualidade, uma vez que melhora as características físico-química dos morangos, pois tende a aumentar o teor em sólidos solúveis totais, ácido ascórbico, acentua a cor, o aroma, o sabor, a firmeza, além de causar o aumento da produtividade da cultura (Schwarz *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2014). Contudo, foi relatado por Andriolo *et al.* (2010) que o excesso deste elemento pode comprometer a qualidade dos morangos, induzir alterações no peso dos frutos e, conseqüentemente, efeitos depressivos na produtividade do morangueiro.

A influência negativa na qualidade dos frutos associada ao excesso de adubação potássica, não é um tema abordado frequentemente em trabalhos da área da nutrição vegetal. Alguns autores referem a ocorrência de danos em maçãs 'Fugi' sujeitas a longos períodos de conservação, danos estes provocados pelo excesso de adubação potássica (Hunsche *et al.*, 2003). De igual modo os valores elevados da razão K:Ca são frequentemente associados ao aumento da suscetibilidade a algumas desordens fisiológicas. Há muito que é conhecida a influência que a razão K:Ca tem na ocorrência de *Bitter pit* em maçãs 'Cox's Orange Pippin' (Van Der Boon, 1980) e na suscetibilidade ao enegrecimento interno em maçãs 'Braeburn' (Neuwald *et al.*, 2014). Deste modo, a fertilização excessiva em K além de causar um aumento na condutividade elétrica da solução nutritiva, pode também resultar numa nutrição desequilibrada das plantas em Ca e outros catiões como o Mg, mesmo que estes estejam em concentração adequada na solução.

O método mais utilizado para avaliar o estado nutricional do morangueiro é a análise química do teor de nutrientes nos diferentes órgãos da planta, principalmente nas folhas (Yavari *et al.*, 2009; Reganold *et al.*, 2010). Entretanto, outros métodos têm sido introduzidos no diagnóstico das respostas fisiológicas das plantas a *stress* nutricionais, tais como as avaliações relacionadas com o teor de clorofilas determinadas através do índice SPAD (Martínez *et al.*, 2017), a fluorescência das clorofilas (Choi *et al.*, 2016), a condutância estomática, a temperatura da folha, o potencial hídrico, a percentagem de água nos diferentes órgãos da planta, o conteúdo relativo em água da folha (Kirkham, 2014) e a área específica das folhas (Yaghubi *et al.*, 2016).

O potencial de utilização dos índices que determinam o teor de clorofilas das folhas como as leituras de SPAD e a fluorescência das clorofilas para detetar deficiência de nutrientes como N, Mg e Fe foi bem estabelecido por El-Jendoubi *et al.* (2011), Martínez *et al.* (2017) e Melo *et al.* (2017). Apesar destes índices não serem comumente relacionados com a nutrição potássica, por este elemento não estar associado à molécula de clorofila, o aumento da concentração de K<sup>+</sup> no meio pode ocasionar o

desequilíbrio na absorção de outros nutrientes, principalmente dos que promovem sintomas de clorose nas folhas, como o N, o Mg e o Fe que alteram o valor destes índices (Cadet e Samson, 2011).

Neste contexto, o objetivo destes estudos foi determinar o desenvolvimento das plantas com base em parâmetros fisiológicos, no crescimento e na produção de frutos de duas cultivares de morangueiro cultivadas em sistema hidropónico, com diferentes doses de potássio disponíveis na solução nutritiva. Para isso foram realizados 2 ensaios:

*Ensaio I* – O objetivo foi avaliar o efeito de diferentes doses de K adicionadas à solução nutritiva em sistema hidropónico contendo areia, nos parâmetros fisiológicos do morangueiro da cultivar San Andreas, nomeadamente, nos parâmetros fotossintéticos e hídricos das plantas, na acumulação de biomassa, na produção de morangos, na partição de K, Ca e Mg pelos diferentes órgãos da planta e parede celular dos morangos.

*Ensaio II* – O objetivo foi avaliar o efeito de diferentes doses de K adicionadas à solução nutritiva em sistema hidropónico do tipo do NGS® (*New Growing System*) contendo substrato comercial à base de perlite e fibra de coco, sobre os parâmetros fisiológicos do morangueiro cultivar Primoris, nomeadamente, nos parâmetros fotossintéticos e hídricos das plantas, na acumulação de biomassa, na partição de K, Ca e Mg pelos diferentes órgãos da planta e parede celular dos morangos, na produção e qualidade dos morangos.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Ensaio I – Utilização de um sistema hidropónico contendo areia como substrato**

#### **2.1.1 Instalação do ensaio e obtenção do material vegetal**

O ensaio foi conduzido em sistema hidropónico, em estufa do tipo gótico não climatizada, com aberturas zenitais de 25% na nave, revestida com filme de policloreto de vinil (PVC), localizada no campo experimental da Universidade de Évora (Pólo da Mitra em Valverde, Évora, Portugal, cujas coordenadas geográficas são 38°31'55.4" N 8°01'04.0" W).

Foram utilizadas plantas de morangueiro certificadas da cv. San Andreas frigoconservadas, de raiz nua, propagadas a partir de estolhos, livres de doenças e com tamanho uniforme de aproximadamente 5 à 7cm, adquiridas em viveiro certificado.

### 2.1.2 Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos foram constituídos por cinco doses de K (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>) definidas a partir da recomendação da solução nutritiva para a cultura do morangueiro proposta por Hennion e Veschambre (1997) modificada. As concentrações de macro e micronutrientes na solução utilizada como controlo encontram-se na Tabela 3. O delineamento experimental utilizado foi em blocos causalizados, com um fator de variação com cinco níveis e 16 repetições.

**Tabela 3.** Concentração de macro e micronutrientes na solução nutritiva utilizada como controlo.

Hennion e Veschambre (1997) modificada			
	[mmol L <sup>-1</sup> ]		[mg L <sup>-1</sup> ]
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	9,40	<b>Mo</b>	0,07
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	2,00	<b>B</b>	0,14
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	1,00	<b>Cu</b>	0,11
<b>K<sup>+</sup></b>	5,70	<b>Mn</b>	0,56
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	3,00	<b>Zn</b>	0,22
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	2,00	<b>Fe</b>	1,13
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	1,00		

### 2.1.3 Descrição do sistema hidropónico utilizado

O sistema hidropónico utilizado era constituído por três fases: fase sólida – areia e pedras do tipo ‘brita’; fase líquida – água e solução nutritiva e fase gasosa – ar. Este sistema foi classificado como sendo do tipo semifechado, pois havia reutilização da solução nutritiva drenada.

O ensaio foi constituído por 5 linhas de cultivo (uma para cada dose de K); cada linha possuía um depósito de polietileno expandido de baixa densidade (PEBD), com capacidade para 500L nos quais se armazenava a solução nutritiva. Cada depósito estava equipado com uma bomba (Power Plus Water: POW 87902 Submersible pump – 250W, 5000L/h). A forma como o sistema foi dimensionado neste ensaio pode ser visualizado no Anexo 1 (Figura 1). O funcionamento da bomba foi automaticamente controlado através da utilização de um temporizador/programador digital previamente definido.

Os vasos utilizados para a cultura (retangulares com 60 x 10,3 x 19,5 cm de comprimento, largura e altura, respetivamente, com capacidade volumétrica para 12L) foram acondicionados por cima de estruturas de aproximadamente 25 cm de altura que serviram como suporte. Havia quatro vasos por linha. Cada vaso possuía seis furos no

fundo para drenagem da solução excedente recolhida num vaso coletor e posteriormente devolvida ao depósito de armazenamento da solução nutritiva.

Os vasos foram preenchidos com uma camada de 'brita' de aproximadamente 10 cm, coberta por um pedaço de rede de sombreamento e o restante volume foi preenchido com areia, perfazendo 6L de areia por vaso. Foi instalado um sistema de rega constituído por tubos de ½ polegada com gotejadores localizados de 20 em 20 cm, do tipo autocompensantes. Utilizaram-se dois tubos de rega por vaso havendo um gotejador disponível para cada planta.

#### **2.1.4 Preparação e maneiio da solução nutritiva**

As fontes de macronutrientes utilizadas para compor os diferentes tratamentos foram os fertilizantes comerciais Adubos de Portugal - ADP<sup>®</sup>: nitrato de amónio (16,9 %  $\text{NO}_3^-$  e 17,6 %  $\text{NH}_4^+$ ), sulfato de magnésio (16 %  $\text{MgO}$  e 32 %  $\text{SO}_3$ ), fosfato de potássio (34 %  $\text{K}_2\text{O}$  e 52 %  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), sulfato de potássio (50 %  $\text{K}_2\text{O}$  e 46,5 %  $\text{SO}_3$ ) e os sais puros para análise (P.A. > [99 %]): nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) e sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ). As fontes de micronutrientes utilizadas foram os fertilizantes comerciais: Yara<sup>®</sup> Nutrel C (0,4 % B; 0,3 % Cu; 7,5 % Fe; 3,7 % Mn; 0,2 % Mo e 0,6 % Zn) e Keliron<sup>®</sup> (6 % Fe-EDDHA e 3 % Fe).

A solução nutritiva de cada tratamento foi preparada com água obtida de furo subterrâneo perfazendo um volume de 240 L. As quantidades (g) utilizadas de cada fonte fertilizante para cada tratamento encontram-se descritas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Quantidade expressa em g 240 L<sup>-1</sup> das fontes fertilizantes contendo macro e micronutrientes adicionadas à água na formulação da solução nutritiva de acordo com cada tratamento contendo as doses de potássio<sup>1)</sup>

Fonte Mineral	Tratamento (mmol L <sup>-1</sup> K)				
	1,8	4,2	5,7	7,4	9,8
	g 240L <sup>-1</sup>				
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	24,55	50,88	24,55	24,55	24,55
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	72,0	72,0	72,0	72,0	72,0
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	103,2	79,2	120,0	120,0	120,0
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	60,0	0	89,54	89,54	89,54
<b>KNO<sub>3</sub></b>	0	31,67	72,0	72,0	72,0
<b>CaSO<sub>4</sub></b>	0	32,64	0	0	0
<b>KCl</b>	0	50,89	0	31,20	74,40
<b>Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	19,11	0	0	0	0
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	76,8	0	0	0	0
<b>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0	50,88	0	0	0
<b>Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	0	72,0	0	0	0

<sup>1)</sup> Todos os tratamentos receberam 36 g e 24 g previamente diluídos das fontes fertilizantes contendo os micronutrientes Yara<sup>®</sup> Nutrel C e Keliron<sup>®</sup>, respectivamente.

A condutividade elétrica (CE) e o pH da água utilizada variavam entre 0,60 e 0,73 mS ds<sup>-1</sup> e 6,8 e 7,2, respectivamente. A análise da água utilizada encontra-se no Anexo 1 (Tabela 1). A solução foi monitorizada a cada dois dias através das medidas de CE com eletrocondutivímetro digital portátil (Hanna instrument<sup>®</sup>, Rhode Island, USA) e do pH com o medidor de pH (Hanna instrument<sup>®</sup>, Rhode Island, USA).

O pH foi mantido em torno de 5,75 ± 0,25 com a adição de solução de correção, à base de hidróxido de sódio (NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>) ou ácido fosfórico (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 10 %) quando necessário. A CE para cada tratamento em ordem crescente foi em média: 2,2; 2,42; 3,1; 3,86 e 3,98 mS ds<sup>-1</sup>.

A troca da solução nutritiva foi realizada sempre que a mesma atingiu 30 % de redução no valor inicial da CE em pelo menos um dos tratamentos e ocorreu sete vezes durante todo o ensaio.

### 2.1.5 Plantação e manutenção do ensaio

As plantas foram transplantadas no dia 17 de março de 2015 para os vasos previamente preenchidos com areia e saturados com água, com uma distância de aproximadamente de 15 cm entre plantas.

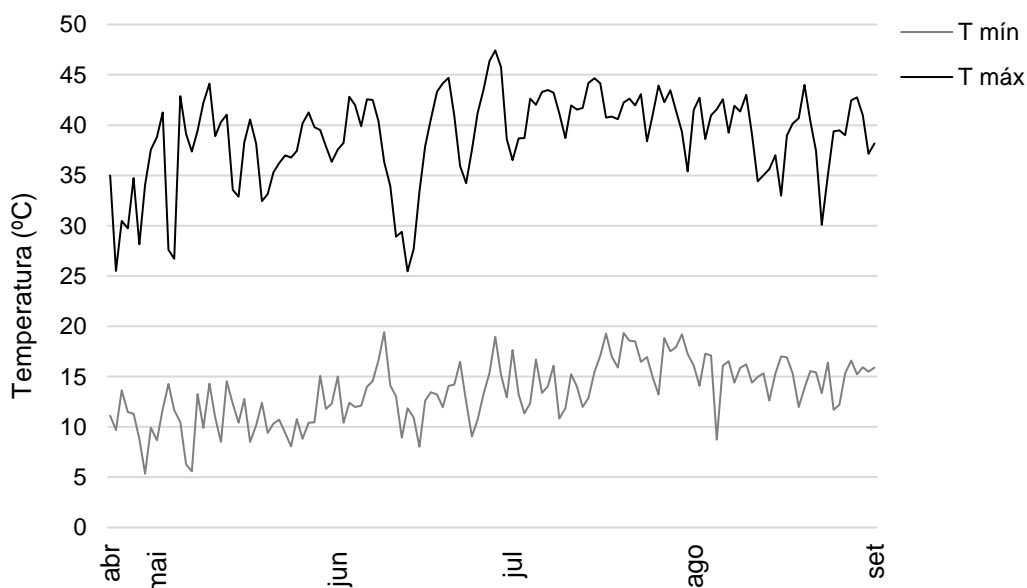
Nos primeiros três dias após a transplantação, as plantas foram regadas somente com água; do quarto ao décimo dia, cada linha de cultivo recebeu 50 ml de

solução nutritiva por planta do respetivo tratamento, com a concentração reduzida a 30 %, quatro vezes ao dia. Após este período, as plantas receberam os tratamentos a 100 % da concentração definida.

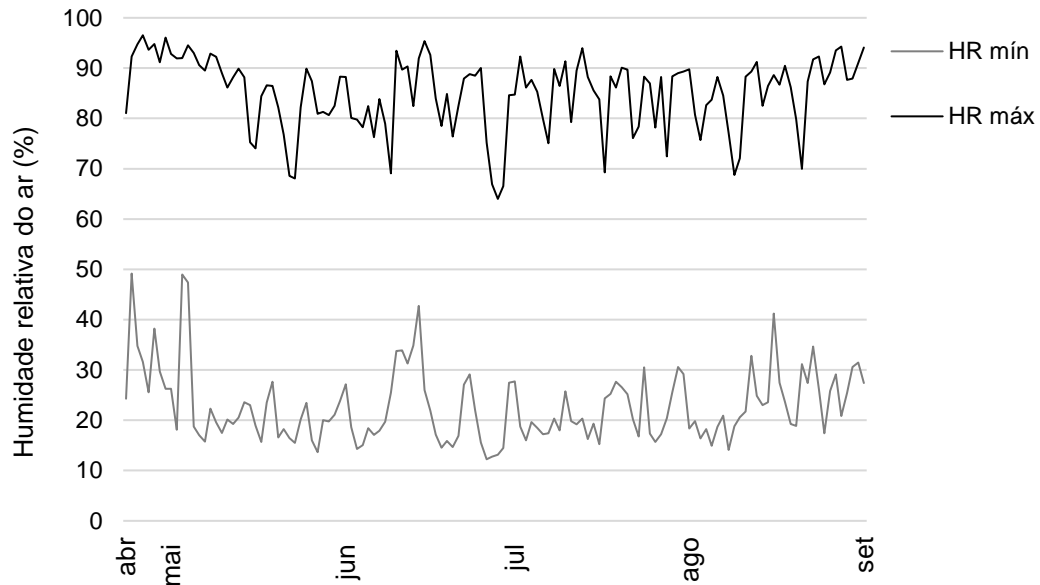
O controlo da rega foi automatizado por um temporizador de rega digital previamente programado para acionar a bomba durante 3 minutos em sete períodos de rega diários. A frequência e a duração da rega foram definidas de acordo com a evapotranspiração da cultura.

Durante todo o ensaio foram realizadas as manutenções necessárias à cultura, como a retirada das folhas secas e estolhos; o tratamento contra afídeos com pulverização das plantas com detergente não iónico Tween 20®, a 5 % em água. Na fase da floração, a polinização foi realizada de forma natural, através de agentes polinizadores da fauna local.

Os valores máximos e mínimos de temperatura e humidade relativa do ar durante a condução do ensaio foram obtidos com o auxílio de um termo-higrómetro digital com armazenamento de dados (MicrologProll, Fourtec, USA) instalado no interior da estufa à altura das plantas, cujas leituras foram realizadas diariamente de 10 em 10 minutos a partir de 24 abril de 2015 até o final do ensaio. Estes dados encontram-se na Figura 3 e 4, respetivamente.



**Figura 3.** Temperaturas máximas e mínimas no interior da estufa durante a condução do ensaio.



**Figura 4.** Umidade relativa do ar máxima e mínima no interior da estufa durante a condução do ensaio.

## 2.1.6 Avaliações

### 2.1.6.1 Avaliação dos parâmetros fisiológicos das plantas

Após 13 semanas da transplantação, as plantas foram avaliadas quanto a alguns importantes parâmetros fisiológicos, tais como o teor em clorofilas, a fluorescência das clorofilas, a condutância estomática, a temperatura das folhas e o potencial hídrico, referidos como 1 a 4 na Tabela 5. Estas avaliações foram repetidas no último dia de manutenção do ensaio na estufa (24 semanas após a transplantação) e no mesmo dia as plantas foram colhidas, arrefecidas a aproximadamente 5 °C em sacos plástico e em caixa térmica contendo barras de gelo e transportadas rapidamente para o Laboratório de Fisiologia Vegetal (Pólo da Mitra, Universidade de Évora), onde foram realizadas as avaliações das massas fresca e seca das folhas, pecíolos e raízes, a percentagem de água, o conteúdo relativo em água e área específica da folha, referidos como 5 a 8 da Tabela 5.



**Tabela 5.** Parâmetros fisiológicos avaliados nos morangueiros, local de determinação na planta e número de plantas utilizadas.

<b>Parâmetros fisiológicos</b>	<b>Determinação na planta</b>
1 - Teor em clorofilas - índice SPAD	Folhas jovens e adultas das 16 plantas de cada tratamento;
2 - Fluorescência das clorofilas	Folhas jovens de 8 plantas de cada tratamento;
3 - Condutância estomática e temperatura da folha	Folíolo terminal de uma folha de 8 plantas de cada tratamento;
4 - Potencial hídrico das folhas	Folhas de 8 plantas de cada tratamento;
5 - Percentagem de água das folhas, pecíolos e raízes	8 plantas de cada tratamento;
6 - Massas fresca e seca das folhas, pecíolos e raízes	8 plantas de cada tratamento;
7 - Conteúdo relativo em água	Folíolo terminal de uma folha de 8 plantas de cada tratamento;
8 - Área específica da folha	Folíolos de uma folha de 8 plantas de cada tratamento.

#### ***Teor em clorofilas - índice SPAD***

O teor total em clorofilas das folhas foi estimado utilizando o medidor de clorofila portátil SPAD-502<sup>®</sup> (Konica Minolta, USA) em folhas jovens (SPAD FJ) e folhas adultas (SPAD FA). O SPAD FJ foi avaliado no folíolo terminal da segunda folha completamente desenvolvida de cada planta, a contar do ápice da planta para a base e o SPAD FA foi mensurado no folíolo terminal da primeira folha totalmente saudável, a contar da base da planta para o ápice.

As medições foram realizadas pela manhã entre as 9 e às 10 horas. Cada medição foi realizada em duas áreas diferentes do folíolo terminal da folha de forma não destrutiva e em tempo real. As leituras deste índice não possuem unidade e variam numa escala de 0 a 100, sendo os valores crescentes associados a intensidade da coloração verde da folha.

#### ***Fluorescência das clorofilas***

A fluorescência das clorofilas foi estimada utilizando um fluorímetro (Pocket PEA, Hansatech Instruments, U.K.) pela manhã (às 10 horas). Uma pequena porção do tecido foliar do folíolo terminal das folhas jovens (sendo estas as mesmas folhas jovens em

que foram feitas as medições do teor em clorofilas) foi submetida à escuridão com o auxílio de pinças próprias do aparelho por um período de 20 minutos, para que os centros do fotossistema II (FSII) estivessem predominantemente na forma oxidada. Após este período, foi encaixada a pinça no fluorímetro, esta foi aberta e recebeu um pulso de luz saturante que induziu a fluorescência foliar, cujo valor de indução foi registado pelo equipamento que disponibilizou em tempo real e de forma não destrutiva os valores da máxima eficiência quântica do FS II ( $F_v/F_m$ ) e do índice de desempenho da fotossíntese ( $PI_{ABS}$ ). As variáveis  $F_v/F_m$  e  $PI_{ABS}$  fornecem informações quantitativas sobre o estado da planta e a sua vitalidade, de acordo com o princípio da equação de Nernst (Srivastava e Strasser, 1999).

### ***Condutância estomática e temperatura da folha***

A condutância estomática ( $g_s$ ) e a temperatura da folha ( $tF$ ) foram avaliadas com um porómetro (AP4, Delta-T Devices, Cambridge, U.K.) às 10 e às 12 horas. Para estas determinações foram escolhidos dois folíolos de folhas distintas, ao acaso, por planta avaliada, estando estes folíolos em boas condições fitossanitárias e aparentemente com o mesmo estágio de desenvolvimento. Os resultados obtidos foram expressos em  $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$  e  $^{\circ}C$  para  $g_s$  e  $tF$ , respetivamente.

### ***Potencial hídrico das folhas***

O potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) foi determinado às 12 horas utilizando uma câmara de pressão tipo Scholander (Model 1000, PMS Instrument Company, USA). Para esta determinação foi retirado de cada planta avaliada um conjunto de folha e pecíolo, estando a folha completamente desenvolvida e em bom estado fitossanitário. Esta foi colocada na câmara de pressão ficando o pecíolo exposto. A pressão interna na câmara foi gradualmente aumentada com a injeção de azoto comprimido até o equilíbrio entre a água na folha e no xilema. O equilíbrio ocorreu quando houve a exsudação da seiva pelo corte feito no pecíolo da folha, tendo-se registado de imediato o valor da pressão (Turner, 1988). Os resultados obtidos foram expressos em MPa.

### ***Percentagem de água e massas fresca e seca das folhas, folíolos, pecíolos e raízes***

Para a determinação da percentagem de água ( $\%H_2O$ ) nos diferentes órgãos das plantas, estas foram separadas em folhas, pecíolos, raízes e folíolos de uma folha

jovem. As raízes foram lavadas em água corrente até a remoção total da areia e o excesso de água foi retirado com auxílio de papel absorvente. Determinou-se o peso fresco (g) dos diferentes órgãos das plantas, com o auxílio de uma balança de precisão (PB153, Mettler Toledo AG, Greifensee, Suíça). O peso seco (g), foi determinado após a secagem do material em estufa a 70 °C até atingirem o peso constante (avaliado regularmente em 6 das amostras). A %H<sub>2</sub>O das folhas, pecíolos, raízes e folíolos foi determinada através da equação:

$$\%H_2O = \frac{PF - PS}{PF}$$

Em que:

%H<sub>2</sub>O = Percentagem de água, em %;

PF = Peso fresco do órgão da planta, em g;

PS = Peso seco do órgão da planta, em g.

### **Conteúdo relativo em água**

O conteúdo relativo em água (RWC, *Relative Water Content*) foi estimado gravimetricamente conforme metodologia proposta por Galmés *et al.* (2007). Foram utilizados três discos retirados com o auxílio de um cilindro de metal do folíolo terminal da segunda folha completamente desenvolvida a contar do ápice da planta para a base.

Cada disco vegetal com 1,75 cm<sup>2</sup>, foi pesado em balança de precisão (PB153, Mettler Toledo AG, Greifensee, Suíça) para obtenção do peso fresco. Em seguida foram colocados em placa de *petri* contendo água destilada. Após 2 horas, estes discos foram pesados para obtenção do peso túrgido e colocados em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C até atingirem o peso constante, sendo então pesados para obtenção do peso seco.

O RWC foi determinado utilizando a equação:

$$RWC = \left[ \frac{PF - PS}{PT - PS} \right]$$

Em que:

RWC = Conteúdo relativo em água, em %;

PF = Peso fresco do disco vegetal, em g;

PS = Peso seco do disco vegetal, em g;

PT = Peso túrgido do disco vegetal, em g.

### **Área específica da folha**

Para a determinação da área específica da folha (SLA – *Specific Leaf Area*), foram utilizados os folíolos da segunda folha completamente desenvolvida a contar do ápice da planta para a base, colocados em superfície plana branca e fotografados com câmara fotográfica (Panasonic, Lumix DMC-LX100).

A área de cada folíolo foi medida com auxílio do programa *Image J* (Image Process Analysis in Java, National Institute of Mental Health, USA). A SLA foi determinada utilizando a equação:

$$SLA = \frac{\Sigma \text{Afolíolos}}{PS \text{ folíolos}}$$

Em que:

SLA = área específica da folha, em m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>;

ΣAfolíolos = somatório da área dos folíolos, em m<sup>2</sup>;

PS = peso seco dos folíolos, em kg.

#### **2.1.6.2 Avaliação da produção de morangos**

Foram realizadas 9 colheitas de morangos durante o ensaio em 2015, em 20 e 28 de julho; 03, 10, 12, 18 e 28 de agosto; e 03 e 09 de setembro.

A produção de morangos foi avaliada em função do número e do peso médio dos morangos obtidos de cada tratamento a cada colheita. Para estas avaliações somente os morangos que não apresentavam nenhuma irregularidade do ponto de vista comercial foram contabilizados.

#### **2.1.6.3 Avaliação do teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta**

##### ***Teor em Ca, K e Mg total nas folhas, pecíolos e raízes***

O teor em K, Ca e Mg total foi determinado na matéria seca das folhas, pecíolos e raízes. Para tal utilizaram-se três amostras compósitas contendo a matéria seca de cada uma das diferentes partes de três plantas de cada tratamento.

Das diferentes partes das plantas previamente secas em estufa à 70 °C e moídas, foram pesadas amostras de aproximadamente 1 g ± 0,01 e posteriormente submetidas a uma digestão nitroperclórica.

As amostras sofreram uma pré digestão durante 12 horas com 1 ml de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub> P.A [65 %]). Posteriormente, foram adicionados mais 3 ml de HNO<sub>3</sub> e as amostras foram levadas à temperatura de ± 95 °C até à digestão total do material orgânico e redução do volume de ácido a metade. Posteriormente, foram adicionados 2 ml de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub> P.A [70 %]) e gradualmente a temperatura foi elevada até 150 °C, onde se manteve até a solução se apresentar cristalina. Filtrou-se a solução com filtro de papel (Whatman™, nº 02) e aferiu-se o volume em balão volumétrico para 25 ml com água destilada.

Cada amostra foi digerida em duplicado e a determinação do teor em Ca, K e Mg total foi efetuada por espectrofotometria de absorção atômica (Spectrometer GBC Scientific Equipment Pty Ltd, model Avanta Σ, Braeside, Austrália) com base na metodologia de Srivastava *et al.* (2008). Os resultados foram expressos em mg g<sup>-1</sup> (mg do elemento Ca, K ou Mg g de massa seca<sup>-1</sup>).

### ***Teor em Ca, K e Mg total nos morangos***

Para a determinação do teor de Ca, K e Mg total foram preparadas três amostras compósitas de frutos provenientes de cada tratamento. Cada amostra compósita consistiu na utilização de seis morangos.

As amostras de morangos foram previamente congeladas e posteriormente liofilizadas, moídas e, após digestão nitroperclórica (cuja metodologia foi descrita no subitem anterior - *Teor em Ca, K e Mg total nas folhas, pecíolos e raízes*). O teor em Ca, K e Mg total nos morangos foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica (Spectrometer GBC Scientific Equipment Pty Ltd, model Avanta Σ, Braeside, Austrália) com base na metodologia de Srivastava *et al.* (2008). Os resultados foram expressos em mg g<sup>-1</sup> (mg de Ca, K ou Mg g de morango liofilizado<sup>-1</sup>).

### ***Extração e teor em Ca, K e Mg na parede celular dos morangos***

A parede celular, também denominada resíduo insolúvel em álcool (AIR, *Alcohol Insoluble Residue*) é o resultado de uma extração de remoção do conteúdo citosólico após a lise celular. Neste ensaio, o AIR foi extraído a partir de 300 g de morangos das mesmas amostras descritas no subitem anterior (*Teor em Ca, K e Mg total nos morangos*).

A preparação do AIR foi feita a partir do procedimento descrito por Coimbra *et al.* (1996) modificado. Para a extração do AIR utilizaram-se frutos congelados provenientes de cada tratamento, os quais foram triturados em etanol (96 %, v/v) na

proporção de 1:4 e fervidas durante 10 minutos. Após o arrefecimento das amostras, estas foram filtradas com auxílio de uma placa porosa sob vácuo obtendo-se o AIR. Este foi lavado com éter dietílico até se apresentar praticamente sem pigmentos. O AIR foi colocado em vidro de relógio e levado a secar em estufa a 60 °C até atingir o peso constante.

Para a determinação do teor em Ca, K e Mg na parede celular foram pesadas amostras de 0,1 g do AIR e submetidas a uma digestão nitroperclórica, como descrita no subitem - *Teor em Ca, K e Mg total nas folhas, pecíolos e raízes*. Após a digestão das amostras, o teor de nutrientes foi obtido por espectrofotometria de absorção atômica (Spectrometer GBC Scientific Equipment Pty Ltd, Avanta  $\Sigma$  model, Hampshire, IN) com base na metodologia de Srivastava *et al.* (2008). Os resultados foram expressos em mg g<sup>-1</sup> (mg de Ca, K ou Mg g de AIR<sup>-1</sup>).

## **2.2 Ensaio II – Utilização do sistema hidropónico do tipo NGS® contendo substrato orgânico comercial**

### **2.2.1 Instalação do ensaio e obtenção do material vegetal**

O ensaio foi conduzido em sistema hidropónico, em estufa do tipo gótico não climatizada, com aberturas zenitais de 25% na nave, revestida com filme de policloreto de vinil (PVC) localizada em campo experimental da Universidade de Évora (Pólo da Mitra em Valverde, Évora, Portugal, cujas coordenadas geográficas são 38°31'55.4" N 8°01'04.0" W).

Foram utilizadas plantas de morangueiro certificadas da cv. Primoris enraizadas em alvéolo, livres de doenças e com tamanho uniforme de aproximadamente 10 cm, adquiridas em viveiro certificado.

### **2.2.2 Tratamentos e delineamento experimental**

Os tratamentos foram constituídos por cinco doses de K (2,15; 4,15; 6,15; 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>) definidas a partir da recomendação da solução nutritiva para a cultura do morangueiro proposta por Hennion e Veschambre (1997) modificada. As concentrações de macro e micronutrientes na solução utilizada como controlo encontram-se na Tabela 6. O delineamento experimental utilizado foi em blocos causalizados, com um fator de variação com cinco níveis e 12 repetições.

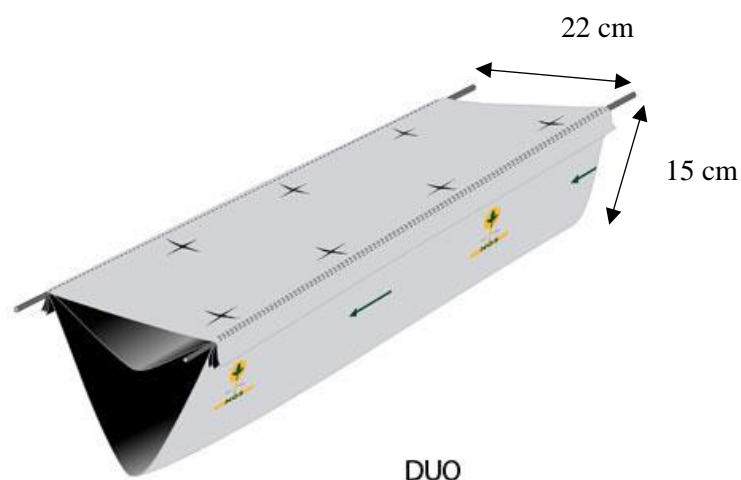
**Tabela 6.** Concentração de macro e micronutrientes na solução nutritiva utilizada como controle.

<b>Hennion e Veschambre (1997) modificada</b>			
	[mmol L <sup>-1</sup> ]		[mg L <sup>-1</sup> ]
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	11,85	<b>Mo</b>	0,07
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	2,00	<b>B</b>	0,14
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	1,00	<b>Cu</b>	0,11
<b>K<sup>+</sup></b>	6,15	<b>Mn</b>	0,56
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	3,00	<b>Zn</b>	0,22
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	1,00	<b>Fe</b>	1,13
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	1,00		

### 2.2.3 Descrição do sistema hidropônico utilizado

O sistema hidropônico utilizado era constituído por três fases: fase sólida – constituída por substrato orgânico contendo volumes iguais de fibra de coco e perlita; fase líquida – água e solução nutritiva e fase gasosa – ar. Este sistema foi classificado como sendo do tipo semifechado, pois havia reutilização da solução nutritiva drenada.

Este sistema foi uma adaptação do NGS<sup>®</sup> (*New Growing System*) projetado para o cultivo do morango (modelo: Multibanda DUO<sup>®</sup>) caracterizado por possuir duas estruturas metálicas laterais que serviam como suporte para prender duas camadas de polietileno interligadas que criavam um circuito em dois níveis. O primeiro nível para acomodar o substrato orgânico e as raízes das plantas. Este nível possuía orifícios utilizados para drenar a solução excedente para o segundo nível que servia como meio de recolha da solução nutritiva drenada (Figura 5).



**Figura 5.** Sistema NGS® modelo Multibanda DUO®, especialmente desenvolvido para o cultivo do morangueiro. Fonte: ngsystem.com.

O sistema era composto por 5 linhas de cultivo (uma para cada dose de K), cada linha possuía um depósito de polietileno expandido de baixa densidade (PEBD), com capacidade para 50L nos quais se armazenava a solução nutritiva e equipado com uma bomba (Power Plus Water: POW 87902 pump – 250 W, 5000 L/h). O funcionamento da bomba foi automaticamente controlado através da utilização de um temporizador/programador digital previamente definido.

As linhas de cultivo foram projetadas com um declive de 2 % para que a solução drenada pudesse ser direcionada para um tubo do tipo PVC acoplado no final da linha. Este tubo foi também projetado com um declive de 2 % em direção ao depósito para facilitar a drenagem da solução. A forma como o sistema foi dimensionado neste ensaio pode ser visualizada em Anexo 2, Figura 1.

As linhas de cultivo foram preenchidas com o substrato orgânico e instalados os tubos de rega do tipo gota-a-gota. Os tubos gotejadores utilizados foram do tipo autocompensantes com ½ polegada, utilizados dois tubos por linha de cultivo, havendo um gotejador disponível para cada planta.

#### 2.2.4 Preparação e manejo da solução nutritiva

As fontes de macro e micronutrientes utilizadas para compor os diferentes tratamentos foram os fertilizantes comerciais Yara®: nitrato de amónio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 16,9 %  $\text{NO}_3^-$  e 17,7 %  $\text{NH}_4^+$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$  – 16 %  $\text{MgO}$  e 32 %  $\text{SO}_3$ ), fosfato monoamónico (MAP – 12 %  $\text{NH}_4^-$  e 61 %  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$  – 13,7 %  $\text{NO}_3^-$  e 46,3 %  $\text{K}_2\text{O}$ ) e sal puro para análise (P.A. > [99 %]): nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ).



As fontes de micronutrientes utilizadas foram os fertilizantes comerciais: Yara<sup>®</sup> Nutrel C (0,4 % B; 0,3 % Cu; 7,5 % Fe; 3,7 % Mn; 0,2 % Mo e 0,6 % Zn) e Keliron<sup>®</sup> (6 % Fe-EDDHA e 3 % Fe).

A solução nutritiva de cada tratamento foi previamente preparada com água destilada e acondicionadas em garrafas escuras de vidro com capacidade para 1 L. Estas soluções foram adicionadas à água obtida de furo subterrâneo perfazendo um volume final de 40 L. Em cada linha de cultivo a solução foi armazenada num depósito com capacidade para 50 L. As quantidades (g L<sup>-1</sup> solução mãe) utilizadas de cada fonte fertilizante para cada tratamento encontram-se na Tabela 7. A quantidade adicionada de cada solução mãe, em ml, para completar os 40 L de solução nutritiva para cada tratamento foram: 20 ml de nitrato de amónio e 200 ml de sulfato de magnésio, nitrato de cálcio, fosfato monoamónico, nitrato de potássio, Yara<sup>®</sup> Nutrel C e Keliron<sup>®</sup>.

**Tabela 7.** Quantidade expressa em g L<sup>-1</sup> das fontes fertilizantes contendo macro e micronutrientes utilizadas na formulação das soluções mãe de acordo com cada tratamento contendo as doses crescentes de potássio<sup>1)</sup>

Fonte Mineral	Tratamento (mmol L <sup>-1</sup> K)				
	2,15	4,15	6,15	8,15	10,15
	g L <sup>-1</sup> solução mãe				
<b>Nitrato de amónio</b>	153,85	153,85	153,85	153,85	153,85
<b>Sulfato de magnésio</b>	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
<b>Nitrato de cálcio</b>	68,88	68,88	68,88	68,88	68,88
<b>Fosfato monoamónico</b>	46,56	89,86	100,06	100,06	100,06
<b>Nitrato de potássio</b>	43,6	84,3	124,9	165,5	206,0

<sup>1)</sup> A solução mãe contendo os micronutrientes foram iguais para todos os tratamentos e foram constituídas de 30 g e 20 g de Yara<sup>®</sup> Nutrel C e Keliron<sup>®</sup>, respetivamente.

A condutividade elétrica (CE) e pH da água utilizada variavam entre 0,40 e 0,71 dS m<sup>-1</sup> e 6,7 e 7,0, respetivamente. A análise laboratorial da água utilizada encontra-se no Anexo 2 (Tabela 1). A solução foi monitorizada a cada dois dias através das medidas de CE com eletrocondutivímetro digital portátil (Hanna instrument<sup>®</sup>, Rhode Island, USA) e pH com o medidor de pH (Hanna instrument<sup>®</sup>, Rhode Island, USA).

O pH foi mantido em torno de 6,25 ± 0,25, com a adição de solução de correção, à base de hidróxido de sódio (NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>) ou ácido fosfórico (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 10 %) quando necessário. A CE para cada tratamento em ordem crescente foi em média: 1,70 ± 0,04; 1,92 ± 0,4; 2,18 ± 0,02; 2,52 ± 0,03 e 2,75 ± 0,06 dS m<sup>-1</sup>.

A troca da solução nutritiva foi realizada sempre que a mesma atingiu 30 % de redução no valor inicial da CE em pelo menos um dos tratamentos e esta foi realizada nove vezes durante todo o ensaio.

### **2.2.5 Plantação e manutenção do ensaio**

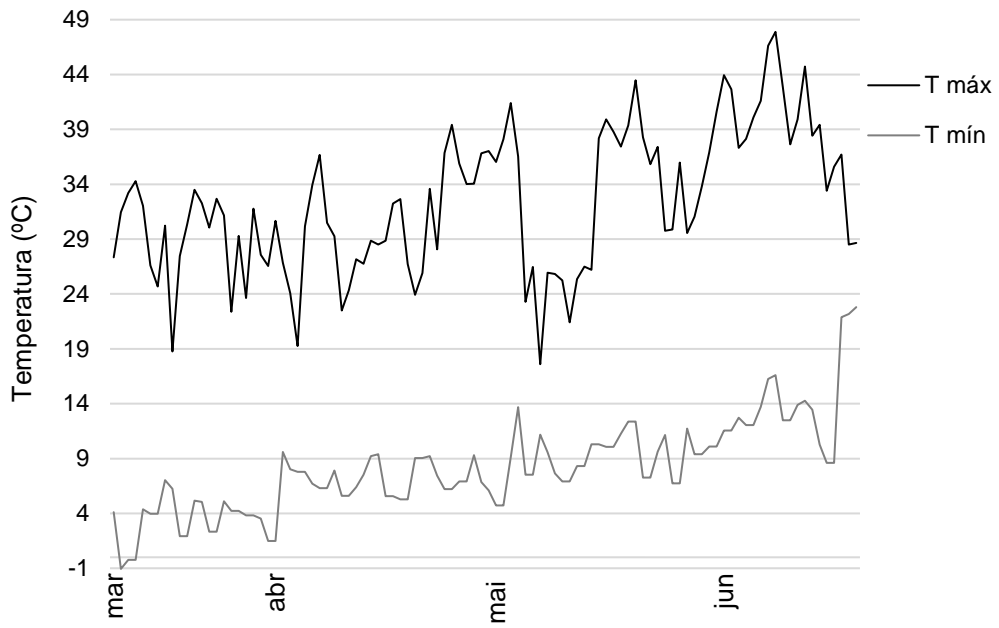
As plantas foram transplantadas no dia 01 de novembro 2015 para o sistema NGS<sup>®</sup> previamente preenchido com o substrato orgânico saturado em água. As plantas foram dispostas em linha dupla, conforme os orifícios que são predefinidos no sistema Multibanda DUO<sup>®</sup> perfazendo uma distância de 15 cm entre plantas.

Nos primeiros três dias após a transplantação, as plantas foram regadas somente com água e do quarto ao sétimo dia com a solução de cada tratamento com a concentração reduzida a 30 %. Após este período, as plantas receberam os tratamentos a 100 % da concentração definida.

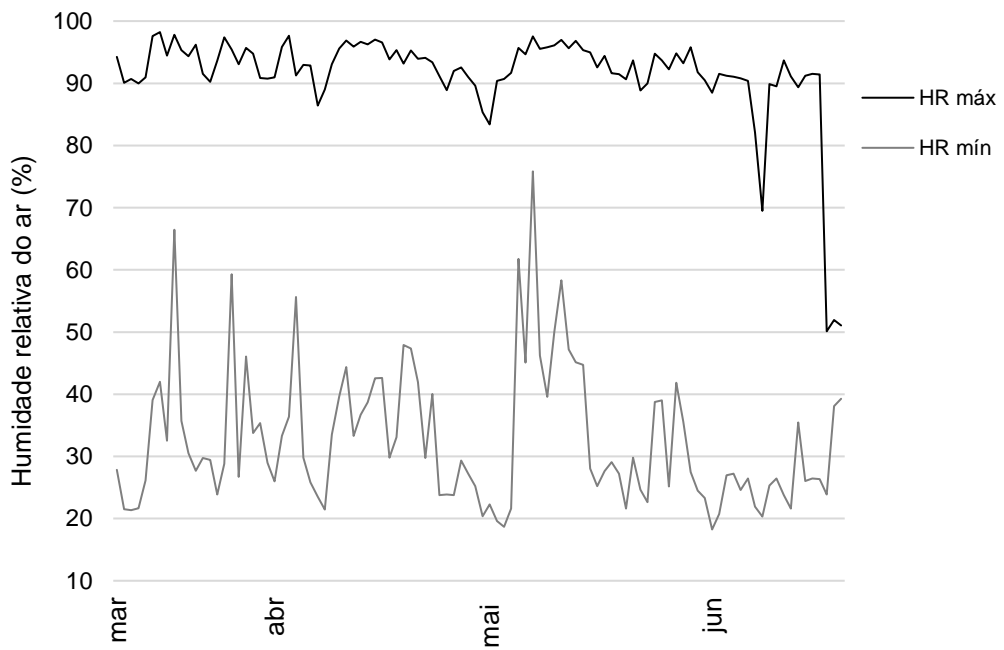
O controlo da rega foi automatizado por um temporizador de rega digital previamente programado para acionar a bomba durante 3 minutos em sete períodos diários. A frequência e a duração da rega foram definidas de acordo com a evapotranspiração da cultura.

Durante todo o ensaio foram realizadas as manutenções necessárias à cultura, como a retirada das folhas secas e o tratamento contra afídeos com pulverização das plantas com detergente não iónico Tween 20<sup>®</sup>, a 5 % em água, quando necessário. Na fase da floração, a polinização foi realizada de forma natural, através de agentes polinizadores da fauna local.

Os valores de temperatura e humidade relativa do ar máxima e mínima durante a condução do ensaio foram obtidos com o auxílio de um termo-higrómetro digital (MicrologProll, Fourtec, USA), com armazenamento de dados a cada 10 minutos, instalado no interior da estufa à altura das plantas de 10 de março a 20 de junho de 2016. Estes dados encontram-se nas Figuras 6 e 7, respetivamente.



**Figura 6.** Temperaturas máximas e mínimas no interior da estufa durante a condução do ensaio.



**Figura 7.** Humidade relativa do ar máxima e mínima no interior da estufa durante a condução do ensaio.

## 2.2.6 Avaliações

### 2.2.6.1 Avaliação dos parâmetros fisiológicos das plantas

Após 15 semanas da transplantação, as plantas foram avaliadas quanto a alguns importantes parâmetros fisiológicos, tais como o teor em clorofilas, a fluorescência das clorofilas, a condutância estomática, a temperatura das folhas e o potencial hídrico, referidos como 1 a 4 na Tabela 8. Estas avaliações foram repetidas no último dia de manutenção do ensaio na estufa (33 semanas após a transplantação) e no mesmo dia as plantas foram colhidas, arrefecidas a aproximadamente 5 °C em sacos plástico e em caixa térmica contendo barras de gelo e transportadas rapidamente para o Laboratório de Fisiologia Vegetal (Pólo da Mitra, Universidade de Évora), onde foram realizadas as avaliações das massas fresca e seca das folhas e pecíolos, da percentagem de água, do conteúdo relativo em água e da área específica da folha, referidos como como 5 a 8 na Tabela 8. A metodologia utilizada para avaliar cada um destes parâmetros foi a mesma utilizada no Ensaio I – Utilização de um sistema hidropónico contendo areia como substrato, descrita em 2.1.6.1 Avaliação dos parâmetros fisiológicos das plantas.

**Tabela 8.** Parâmetros fisiológicos avaliados nos morangueiros, local de determinação na planta e número de plantas utilizadas.

Parâmetros fisiológicos	Determinação na planta
1 - Teor em clorofilas - índice SPAD	Folhas jovens e adultas das 12 plantas de cada tratamento;
2 - Fluorescência das clorofilas	Folhas jovens das 12 plantas de cada tratamento;
3 - Condutância estomática e temperatura da folha	Folíolo terminal de uma folhas das 12 plantas de cada tratamento;
4 - Potencial hídrico das folhas	Folhas de 8 plantas de cada tratamento;
5 - Percentagem de água das folhas e Pecíolos	12 plantas de cada tratamento;
6 - Massas fresca e seca das folhas e pecíolos	12 plantas de cada tratamento;
7 - Conteúdo relativo em água	Folíolo terminal de uma folha de 8 plantas de cada tratamento;
8 - Área específica da folha	Folíolos de uma folha de 8 plantas de cada tratamento.

### **2.2.6.2 Avaliação da produção de morangos**

Foram realizadas 16 colheitas durante o ensaio em 2016, em 15, 22 e 29 de fevereiro; 07 e 16 de março; 04, 08, 12, 15, 19 e 25 de abril; 02, 06, 12 e 23 de maio; e 01 de junho.

A produção de morangos foi estimada em função do número e do peso médio dos morangos obtidos de cada tratamento a cada colheita. Para estas avaliações somente os morangos que não apresentavam nenhuma irregularidade do ponto de vista comercial foram contabilizados.

### **2.2.6.3 Avaliação da qualidade físico-química dos morangos**

Os morangos produzidos foram avaliados quanto ao peso, firmeza, cor ( $L^*$ ,  $h^\circ$  e  $C^*$ ), sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), pH e relação SST/AT. Estas avaliações foram feitas formando uma amostra compósita dos frutos obtidos a cada duas datas de colheita, totalizando 8 avaliações ao longo do período de produção. Para estas avaliações, os morangos que apresentavam alguma irregularidade do ponto de vista comercial eram descartados.

#### ***Firmeza***

A análise da firmeza foi realizada utilizando texturómetro TA.HD.Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) equipado com sonda cilíndrica de 3 mm de base plana (P\3). As medições foram realizadas num ponto único na zona equatorial de cada um dos morangos inteiros. A profundidade de penetração foi de 8 mm e considerou-se a velocidade de avanço da sonda de  $1 \text{ mm s}^{-1}$ . Os dados obtidos foram da força máxima em Newtons (N) no gráfico contendo a Força vs Deformação.

#### ***Cor ( $L^*$ , $h^\circ$ e $C^*$ )***

A cor da epiderme dos morangos foi determinada com auxílio de colorímetro Minolta CR 400 Konica Minolta (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japão), no padrão C.I.E  $L^*a^*b^*$ , em que a coordenada  $L^*$  expressa o grau de luminosidade da cor medida ( $L^* = 100 = \text{branco}$ ;  $L^* = 0 = \text{preto}$ ); os valores  $a^*$  e  $b^*$  expressam a componente cromática do vermelho/verde e amarelo/azul, respetivamente e foram utilizados para calcular o ângulo Hue,  $h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$  que expressa a intensidade da tonalidade da cor (valor de  $h^\circ = 0^\circ = \text{cores púrpuras}$ ;  $h^\circ = 90^\circ = \text{coloração amarelada}$ ;  $h^\circ = 180^\circ = \text{coloração}$

verde azulada;  $h^{\circ} = 270^{\circ}$  = coloração azul) e o croma,  $C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$  que expressa a saturação da cor entre mais viva ou mais pálida.

Para determinação destes parâmetros foram realizadas duas leituras em lados opostos, na região equatorial dos morangos colhidos por cada tratamento. As leituras foram realizadas com o iluminante C, ângulo de visão de  $2^{\circ}$  em área de 8 mm de diâmetro.

### **Sólidos solúveis totais (SST)**

Para a determinação dos sólidos solúveis totais (SST), foram cortadas as sépalas juntamente com o pedicelo dos frutos e retiradas algumas gotas de sumo. O SST foi avaliado por refratometria utilizando o refratômetro digital Atago PR-101 (Atago CO., Ltd, Tóquio, Japão) previamente calibrado com água destilada, com precisão de  $\pm 0,2\%$  para um espectro de  $^{\circ}$ Brix entre 0 e 45 % a  $25^{\circ}\text{C}$ .

O valor dos SST obtido por fruto foi expresso em  $^{\circ}$ Brix.

### **Acidez titulável (AT), potencial hidrogeniônico (pH) e razão SST/AT**

Após a determinação dos SST dos morangos, estes foram divididos em duas amostras compósitas com número de frutos equivalente. Cada amostra foi triturada e a partir da polpa de frutos obtida, foram pesados 6 g e diluídos em 50 ml de água destilada. Nesta diluição foram realizadas as análises do pH e acidez titulável (AT), utilizando o titulador automático (Crison Compact Tritador – versão S, Crison Instruments, S.A., Barcelona, Espanha) previamente calibrado com soluções padrão de pH 4,01 e 7,00.

As leituras foram realizadas através débito de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M na solução de trabalho até atingir um valor de pH de 8,2. O valor do pH foi obtido diretamente e o valor de AT foi expresso como percentual de ácido cítrico (%) através da equação:

$$AT = \frac{V \times N \times 0,064}{P} \times 100$$

Em que:

AT = acidez titulável, em % de ácido cítrico;

V = volume de NaOH gasto na titulação, em ml;

N = normalidade de solução de NaOH

P = peso da amostra de polpa de 'frutos' utilizada na titulação, em g;

Meq. de ácido cítrico = 0,064

A razão SST/AT é frequentemente utilizada como índice de qualidade pós-colheita dos frutos e foi obtida pela divisão entre os dois parâmetros.

#### **2.2.6.4 Teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta**

##### ***Teor em Ca, K e Mg total nas folhas e pecíolos***

O teor em K, Ca e Mg total foi determinado na matéria seca das folhas e pecíolos. Para tal utilizaram-se três amostras compósitas contendo a matéria seca de cada uma das diferentes partes de três plantas de cada tratamento.

A descrição detalhada da metodologia utilizada para a avaliação deste parâmetro foi a mesma utilizada no Ensaio I – Utilização de um sistema hidropônico contendo areia como substrato, descrita em 2.1.6.3 Avaliação do teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta – Teor em Ca, K e Mg total nas folhas, pecíolos e raízes.

##### ***Teor em Ca, K e Mg total nos morangos***

Para a determinação do teor de Ca, K e Mg total foram preparadas quatro amostras compósitas de frutos provenientes de cada tratamento. Cada amostra compósita consistiu na utilização de oito morangos.

A descrição detalhada da metodologia utilizada para a avaliação deste parâmetro foi a mesma utilizada no Ensaio I – Utilização de um sistema hidropônico contendo areia como substrato, descrita em 2.1.6.3 Avaliação do teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta – Teor em Ca, K e Mg total nos morangos.

##### ***Extração e teor em Ca, K e Mg na parede celular dos morangos***

O resíduo insolúvel em álcool (AIR) dos morangos foi extraído a partir de 400 g de morangos das mesmas amostras descritas no subitem anterior (*Teor em Ca, K e Mg total nos morangos*).

A descrição detalhada da metodologia utilizada para a avaliação deste parâmetro foi a mesma utilizada no Ensaio I – Utilização de um sistema hidropônico contendo areia como substrato, descrita em 2.1.6.3 Avaliação do teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta – Extração e teor em Ca, K e Mg na parede celular dos morangos.

### **2.3 Análise estatística dos dados**

Os dados obtidos nos ensaios I e II foram submetidos à análise de variância (Anova) e comparação de médias realizada pelo teste de Tukey, com nível de significância  $p \leq 0,05$ . Foi realizada a análise de correlação de Pearson, entre alguns parâmetros avaliados na fisiologia das plantas, com nível de significância  $p \leq 0,05$ . As tabelas com as matrizes de correlação entre parâmetros estão apresentadas para o Ensaio I em Anexo 1, tabela 2 e para o Ensaio II em Anexo 2, tabela 2.

Para todas as análises e testes estatísticos mencionados, foi utilizado o programa estatístico SPSS® for Windows, Statistic version 24 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.).



### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Ensaio I – Utilização de um sistema hidropônico contendo areia como substrato

##### 3.1.1 Efeito das doses de potássio na fisiologia das plantas e na produção de frutos

###### 3.1.1.1 Fisiologia

Os resultados obtidos para o índice SPAD na folha jovem (FJ) e adulta (FA), para o índice de desempenho da fotossíntese ( $PI_{abs}$ ) e a máxima eficiência quântica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) das plantas nas avaliações realizadas na 13ª e 24ª semanas após a transplantação dos morangueiros apresentam-se na Tabela 9.

**Tabela 9.** Índice SPAD nas folhas jovens (FJ) e adultas (FA), índice de desempenho da fotossíntese ( $PI_{abs}$ ) e máxima eficiência quântica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) (média  $\pm$  erro padrão) avaliados na 13ª semana (1ª avaliação) e 24ª semana (2ª avaliação) após a transplantação dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>).

13ª semana após a transplantação dos morangueiros (1ª Avaliação)				
Dose K	SPAD FJ	SPAD FA	$PI_{abs}$	$F_v/F_m$
1,8	45,4 $\pm$ 0,85a	47,8 $\pm$ 0,37a	10,2 $\pm$ 0,63b	0,828 $\pm$ 0,002a
4,2	44,2 $\pm$ 0,93a	47,1 $\pm$ 1,04a	11,3 $\pm$ 0,43ab	0,833 $\pm$ 0,001a
5,7	42,7 $\pm$ 0,79a	43,9 $\pm$ 0,70b	10,9 $\pm$ 0,51ab	0,834 $\pm$ 0,001a
7,4	42,7 $\pm$ 0,65a	46,1 $\pm$ 1,02ab	10,9 $\pm$ 0,53ab	0,834 $\pm$ 0,001a
9,8	45,1 $\pm$ 0,80a	47,6 $\pm$ 0,61a	12,8 $\pm$ 0,60a	0,832 $\pm$ 0,002a
24ª semana após a transplantação dos morangueiros (2ª Avaliação)				
Dose K	SPAD FJ	SPAD FA	$PI_{abs}$	$F_v/F_m$
1,8	42,1 $\pm$ 0,47a	45,5 $\pm$ 0,49ab	10,0 $\pm$ 0,42a	0,840 $\pm$ 0,003ab
4,2	42,0 $\pm$ 0,99a	47,1 $\pm$ 0,51a	10,7 $\pm$ 0,41a	0,841 $\pm$ 0,002a
5,7	41,7 $\pm$ 0,56a	43,6 $\pm$ 0,50b	10,2 $\pm$ 0,52a	0,838 $\pm$ 0,001ab
7,4	41,9 $\pm$ 0,62a	44,9 $\pm$ 0,43b	9,8 $\pm$ 0,59a	0,835 $\pm$ 0,002ab
9,8	42,3 $\pm$ 0,57a	44,8 $\pm$ 0,61b	11,1 $\pm$ 0,66a	0,833 $\pm$ 0,002b

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O índice SPAD é utilizado como uma estimativa do teor de clorofilas e geralmente apresenta correlação linear direta com a concentração de azoto (N) (Bullock

e Anderson, 1998; Schröder *et al.*, 2000) e ferro (Fe) (El-Jendoubi *et al.*, 2011), estando normalmente associado à intensidade da cor verde das folhas.

As doses de K não apresentaram efeito significativo sobre o teor de clorofilas nas folhas jovens (SPAD FJ) nas duas avaliações realizadas. No entanto, os valores deste índice obtidos em ambas as folhas, jovens (FJ) e adultas (FA) das plantas avaliadas parecem indicar que estas, com 13 semanas de desenvolvimento, estavam ligeiramente mais verdes do que as folhas com 24 semanas.

O efeito das diferentes doses de K sobre o índice SPAD só pode ser observado nas FA a partir da dose controle ( $5,7 \text{ mmol L}^{-1}$  de K), que apresentaram o menor valor para este índice em ambas as avaliações realizadas. Apesar deste índice não ser comumente relacionado com a nutrição potássica da planta, o aumento da condutividade elétrica promovido pelas doses crescentes de K poderia ocasionar o desequilíbrio na absorção de outros nutrientes, principalmente dos que promovem sintomas de clorose como N, Mg e Fe afetando o valor SPAD nas folhas. As variações no valor do índice SPAD observadas neste ensaio, foram também relatadas por Roosta (2014) e Martínez *et al.* (2017) que encontram valores de SPAD para as folhas do morangueiro entre 26,7 e 58,4. Estas variações normalmente também podem ocorrer em função da cultivar, estágio fenológico, ciclo da cultura e condições de cultivo (El-Jendoubi *et al.*, 2011; Pestana *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2017).

Neste ensaio, não foram visualizadas anomalias na coloração verde das folhas dos morangueiros e aparentemente as plantas mantiveram-se verdes independentemente da dose de K. Sun *et al.* (2015) ao estudarem a cv. San Andreas, obtiveram um índice SPAD médio em folhas adultas que consideraram sem nenhuma anomalia de cor de 49,2. Estes mesmos autores ao estudarem o efeito da salinidade sobre o índice SPAD de sete cultivares de morangueiro, não observaram em folhas adultas, efeito significativo da concentração salina neste índice.

A medição de parâmetros relacionados com a fluorescência das clorofilas tem apresentado grande interesse em estudos que visam avaliar plantas sob condições de *stress* bióticos e abióticos que afetam diretamente a fotossíntese (Melo *et al.*, 2017; Yadav *et al.*, 2017). Neste ensaio, houve efeito das doses de K sobre a performance fotossintética das plantas, medida através da fluorescência das clorofilas com o índice de desempenho ( $PI_{abs}$ ) e a máxima eficiência quântica do FSII ( $F_v/F_m$ ).

O  $PI_{abs}$  é um parâmetro sensível a vários tipos de *stress* e é amplamente utilizado para comparar reações fotoquímicas primárias (Strasser *et al.*, 2004), uma vez que incorpora os processos de transferência de energia dos primeiros eventos de absorção,

até à redução dos recetores finais de eletrões do fotossistema I (FSI) (Martinazzo *et al.*, 2012).

A máxima eficiência quântica do FSII é obtida através da relação  $F_v/F_m = F_m - F_0/F_m$ . Quando os centros de reação de PSII estão abertos (no escuro) e uma luz de baixa intensidade é fornecida, o PSII emite um valor mínimo de fluorescência,  $F_0$ . A emissão de fluorescência aumenta rapidamente a partir de um nível mínimo e atinge um máximo ( $F_m$ ) logo após o início da iluminação (Yadav *et al.*, 2017). A diferença entre  $F_0$  e  $F_m$  é denominada como fluorescência variável,  $F_v$ . A relação  $F_v/F_m$  é relatada como um bom indicador de *stress* salino nas folhas, uma vez que indica danos no aparelho fotossintético (Krause e Weis, 1991; Yadav *et al.*, 2017).

Na avaliação realizada na 13ª semana após a transplantação dos morangueiros, houve efeito benéfico da dose mais elevada de K ( $9,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ) sobre o  $PI_{\text{abs}}$  e correlações positivas entre o  $PI_{\text{abs}}$  e  $F_v/F_m$  ( $r = 0,86$ ;  $p \leq 0,01$ ). Na avaliação realizada na 24ª semana, não houve efeito das doses de K sobre este parâmetro e foi observada uma ligeira redução nos valores deste índice em relação à avaliação realizada na 13ª semana.

Houve um aumento significativo no valor deste parâmetro a partir da dose  $4,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de K, sendo máximo ( $12,8 \pm 0,6$ ) na dose mais elevada ( $9,8 \text{ mmol L}^{-1}$  de K). Estes resultados sugerem que a aplicação de K aumenta o desempenho do FSI das folhas e não interfere na máxima eficiência quântica do FSII neste estágio de desenvolvimento (13ª semana após a transplantação dos morangueiros). No entanto, com o passar do tempo de desenvolvimento das plantas, como observado na avaliação realizada na 24ª semana após a transplantação dos morangueiros, a aplicação de K parece não exercer efeito sobre as reações fotoquímicas primárias da cultivar de morangueiro estudada e causa uma ligeira redução na relação  $F_v/F_m$ .

Verificou-se uma correlação positiva na avaliação realizada na 13ª semana após a transplantação dos morangueiros entre o  $PI_{\text{abs}}$  e o SPAD FJ ( $r = 0,63$ ;  $p \leq 0,05$ ), ambos medidos na mesma folha (FJ). O índice SPAD estima o teor em clorofilas das folhas e está diretamente relacionado com a capacidade fotossintética da planta (Ma *et al.*, 2012). Outros autores também verificaram a existência de uma correlação positiva entre o  $PI_{\text{abs}}$  e o SPAD FJ na espécie *Atriplex nummularia* (Melo *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos para a condutância estomática ( $g_s$ ), temperatura da folha ( $t_F$ ) e potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) das folhas nas avaliações realizadas na 13ª e 24ª semana após a transplantação dos morangueiros apresentam-se na Tabela 10.

**Tabela 10.** Condutância estomática às 10h ( $g_s10h$ ) e às 12h ( $g_s12h$ ), temperatura da folha às 10h ( $tF10h$ ) e às 12h ( $tF12h$ ) e potencial hídrico das folhas ( $\Psi_w$ ) (média  $\pm$  erro padrão) avaliados na 13ª semana (1ª avaliação) e 24ª semana (2ª avaliação) após a transplantação dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>).

13ª semana após a transplantação dos morangueiros (1ª Avaliação)					
Dose K	$g_s10h$ (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$g_s12h$ (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$tF10h$ (°C)	$tF12h$ (°C)	$\Psi_w$ (MPa)
<b>1,8</b>	132 $\pm$ 18a	157 $\pm$ 15a	27,6 $\pm$ 0,48a	30,9 $\pm$ 0,19a	-0,55 $\pm$ 0,02a
<b>4,2</b>	136 $\pm$ 18a	171 $\pm$ 14a	27,3 $\pm$ 0,54a	31,1 $\pm$ 0,20a	-0,48 $\pm$ 0,02a
<b>5,7</b>	139 $\pm$ 17a	160 $\pm$ 10a	27,5 $\pm$ 0,61a	31,2 $\pm$ 0,19a	-0,64 $\pm$ 0,30a
<b>7,4</b>	129 $\pm$ 20a	177 $\pm$ 20a	27,0 $\pm$ 0,56a	31,2 $\pm$ 0,18a	-0,46 $\pm$ 0,20a
<b>9,8</b>	118 $\pm$ 18a	144 $\pm$ 14a	27,1 $\pm$ 0,46a	31,4 $\pm$ 0,17a	-0,42 $\pm$ 0,10a
24ª semana após a transplantação dos morangueiros (2ª Avaliação)					
Dose K	$g_s10h$ (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$g_s12h$ (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$tF10h$ (°C)	$tF12h$ (°C)	$\Psi_w$ (MPa)
<b>1,8</b>	95 $\pm$ 7a	103 $\pm$ 22b	25,62 $\pm$ 0,68a	28,16 $\pm$ 2,42a	-1,14 $\pm$ 0,09a
<b>4,2</b>	127 $\pm$ 13a	136 $\pm$ 18ab	25,31 $\pm$ 0,71a	27,71 $\pm$ 2,37a	-1,09 $\pm$ 0,07a
<b>5,7</b>	122 $\pm$ 11a	177 $\pm$ 15a	25,26 $\pm$ 0,68a	27,59 $\pm$ 2,31a	-0,88 $\pm$ 0,06a
<b>7,4</b>	98 $\pm$ 8a	141 $\pm$ 13ab	25,16 $\pm$ 0,66a	27,39 $\pm$ 2,26a	-0,90 $\pm$ 0,04a
<b>9,8</b>	99 $\pm$ 8a	133 $\pm$ 14ab	24,75 $\pm$ 0,75a	27,38 $\pm$ 2,27a	-0,99 $\pm$ 0,07a

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As respostas das plantas avaliadas através de indicadores fisiológicos como a condutância estomática, temperatura foliar, potencial hídrico, conteúdo relativo em água e percentagem de água nos diferentes órgãos vegetativos são capazes de identificar o estado hídrico das plantas (Kirkham, 2014), que segundo alguns autores, podem estar intimamente relacionadas com a nutrição potássica (Wang e Wu, 2013).

Houve um efeito positivo do aumento das doses de K sobre a condutância estomática na avaliação realizada na 24ª semana após transplantação dos morangueiros medida às 12 horas ( $g_s12h$ ). Nestas plantas, a dose controlo (5,7 mmol L<sup>-1</sup> de K) apresentou o valor mais elevado para a condutância estomática (177 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Ainda que não haja diferenças estatísticas significativas, a dose 1,8 mmol L<sup>-1</sup> de K parece induzir uma condutância estomática menor às 10 horas ( $g_s10h$ ) nos morangueiros avaliados na 24ª semana após a transplantação. No processo de abertura estomática é observado um aumento na concentração de K nas células-guarda, o que provocou a entrada de água nestas células com consequente aumento da pressão responsável pela abertura dos estomas (Taiz e Zeiger, 2012). Com efeito, vários autores

referem que os estomas podem ter dificuldades em abrir completamente sob condições de deficiência em K (Tomemori *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2011; Wang e Wu, 2013).

São escassos os trabalhos que visam comparar o efeito da concentração de K no meio sobre a condutância estomática das folhas do morangueiro sem submeter estas plantas a outros tipos de *stress* como o hídrico, salino ou infeções fúngicas. Nestes casos, a literatura sugere que o efeito do K na condutância estomática só é observado quando as plantas são submetidas a algum tipo de *stress* e posteriormente são fertilizadas de K (Ashley *et al.*, 2005; Amtmann *et al.*, 2008; Wang e Wu, 2013).

Comparando os valores de condutância estomática medida às 10 e às 12 horas,  $g_s$ 10h e  $g_s$ 12h, respetivamente, nota-se um incremento superior a 15 % no valor da  $g_s$ 12h em relação a  $g_s$ 10h nas duas avaliações realizadas (13<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana após a transplantação dos morangueiros). A abertura estomática superior nas avaliações de  $g_s$ 12h, está de acordo com o facto de a luz ser o fator ambiental condicionante da abertura e fecho estomático em plantas não sujeitas a *stress* hídrico (Taiz e Zeiger, 2012). Contudo, presume-se que nos horários mais quentes do dia a  $g_s$  diminua para evitar que o potencial hídrico da folha seja reduzido abaixo de níveis considerados críticos para a estabilidade do sistema de transporte de água da planta (Oren *et al.*, 1999). Porém, o aumento na condutância estomática nas avaliações realizadas às 12 horas, pode dever-se ao facto de a esta hora ainda não ter sido atingida a temperatura atmosférica máxima dentro da estufa.

O facto dos valores médios de  $g_s$  obtidos neste ensaio serem inferiores ao valor médio obtido por Sun *et al.* (2015) para a cv. San Andreas ( $302 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), pode estar relacionada com a temperatura do ar no interior da estufa. Esta diferença pode ter ocorrido devido ao facto das suas plantas terem sido cultivadas em estufas com temperatura controlada para 26,5 °C e as plantas deste ensaio terem sido cultivadas a maior parte do ciclo a temperaturas superiores a 35 °C. Assim, os valores de condutância relativamente baixos observados nas duas avaliações realizadas neste ensaio (13<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana após a transplantação dos morangueiros), parecem ser explicados pelas temperaturas elevadas que ocorriam habitualmente no interior da estufa e não pelas diferentes doses de K.

As diferentes doses de K não influenciaram significativamente a temperatura das folhas tanto às 10 (tF10h), como às 12 horas (tF12h) em ambas as avaliações (13<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana após a transplantação dos morangueiros). A temperatura das folhas está negativamente relacionada com a transpiração (Morales *et al.*, 2015) que é um dos principais mecanismos de arrefecimento das plantas. Na primeira avaliação, este comportamento foi observado quando se correlacionou a tF com a  $g_s$ . Verificaram-se

valores de correlação negativa elevados e significativos entre a tF12h e a g<sub>s</sub>10h (r = - 0,83; p ≤ 0,01) e g<sub>s</sub>12h (r = - 0,77; p ≤ 0,01). Assim, os valores de g<sub>s</sub> relativamente baixos observados nas duas avaliações neste ensaio podem ser explicados por esta relação entre a tF provocada pela temperatura do ar dentro da estufa e não pelas diferentes doses de K.

O potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) não foi influenciado pelas doses de K em ambas as avaliações realizadas (13<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana após a transplantação dos morangueiros). No entanto, valores mais negativos de  $\Psi_w$  foram observados nos morangueiros na 24<sup>a</sup> semana após a transplantação. A variação nos valores do  $\Psi_w$  entre as duas avaliações realizadas pode estar relacionada com a fase de desenvolvimento em que as plantas foram avaliadas e com as condições atmosféricas no dia da avaliação. De facto, esta situação pode ser explicada pela correlação negativa entre  $\Psi_w$  e tF12h (r = - 0,28; p ≤ 0,01) na 13<sup>a</sup> semana e na 24<sup>a</sup> semana de desenvolvimento das plantas, com a tF10h (r = - 0,58; p ≤ 0,01) e tF12h (r = - 0,58; p ≤ 0,01). O  $\Psi_w$  pode variar também em função da cultivar como mostrado por Grant *et al.* (2010) ao avaliar o  $\Psi_w$  de dez diferentes cultivares de morangueiro, onde obteve variações de valores entre -0,8 e -2,0 MPa.

Os resultados obtidos para a percentagem de água (% H<sub>2</sub>O) das folhas, pecíolos e raízes das plantas apresentam-se na Tabela 11.

**Tabela 11.** Percentagem de água (% H<sub>2</sub>O) das folhas, pecíolos e raízes (média ± erro padrão) dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>).

Dose K	% H <sub>2</sub> O Folhas	% H <sub>2</sub> O Pecíolos	% H <sub>2</sub> O Raízes
<b>1,8</b>	0,76 ± 0,014a	0,85 ± 0,004a	0,81 ± 0,01ab
<b>4,2</b>	0,75 ± 0,004a	0,85 ± 0,003a	0,83 ± 0,01a
<b>5,7</b>	0,75 ± 0,005a	0,85 ± 0,004a	0,75 ± 0,03b
<b>7,4</b>	0,76 ± 0,003a	0,86 ± 0,003a	0,85 ± 0,01a
<b>9,8</b>	0,75 ± 0,005a	0,86 ± 0,004a	0,84 ± 0,01a

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Não houve efeito das doses de K sobre a %H<sub>2</sub>O na parte aérea das plantas (folhas e pecíolos). Devido à ausência deste efeito nos demais parâmetros que medem a condição hídrica da planta ( $\Psi_w$  e g<sub>s</sub>), era esperado que também não houvesse influência do K na %H<sub>2</sub>O.

No entanto, nas raízes a dose controlo (5,7 mmol L<sup>-1</sup> de K) apresentou um valor significativamente menor de %H<sub>2</sub>O (0,75). Porém, comumente, este parâmetro é avaliado nas folhas ou folíolos no morangueiro e, neste ensaio, as %H<sub>2</sub>O para estes

órgãos vegetativos estão de acordo com os valores obtidos por Martínez-Ferri *et al.* (2016), quando compararam a %H<sub>2</sub>O das folhas e folíolos de seis cultivares de morangueiro não sujeitas a *stress* hídrico.

As doses de K também não influenciaram a %H<sub>2</sub>O, o conteúdo relativo em água (RWC) e a área específica (SLA) no folíolo (Tabela 12).

Yaghubi *et al.* (2016), ao comparar o efeito do aumento da CE em duas cultivares de morangueiro, concluíram que o K adicionado ao meio foi capaz de recuperar o RWC das plantas que estavam mantidas sob elevada CE. Contudo, em condições em que as plantas não foram mantidas sob alta CE, a aplicação de doses crescentes de K não apresentou efeito significativo sobre o RWC das folhas, com valor médio de 0,85 %.

**Tabela 12.** Percentagem de água (% H<sub>2</sub>O) dos folíolos, conteúdo relativo em água dos folíolos (RWC) e área específica dos folíolos (SLA) (média ± erro padrão) dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>).

Dose K	% H <sub>2</sub> O Folíolos	RWC (%)	SLA (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )
1,8	0,72 ± 0,007a	0,88 ± 0,01a	18,1 ± 0,65a
4,2	0,73 ± 0,003a	0,88 ± 0,01a	19,4 ± 0,52a
5,7	0,74 ± 0,003a	0,90 ± 0,01a	21,4 ± 1,49a
7,4	0,74 ± 0,008a	0,95 ± 0,06a	21,4 ± 0,80a
9,8	0,73 ± 0,005a	0,87 ± 0,01a	18,7 ± 0,57a

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A área específica foliar (SLA) também não foi influenciada pelas doses de K. Este resultado está de acordo com os obtidos por Yaghubi *et al.* (2016) que, ao disponibilizarem 1000 e 1500 ppm de silicato de potássio aos morangueiros, não encontraram diferenças significativas entre doses, com SLA médio para a cv. Kurdistan de 22,35 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> e para a cv. Paros de 34,62 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>.

### 3.1.1.2 Biomassa e produção de frutos

Os resultados obtidos para a produção de biomassas fresca e seca pelos diferentes órgãos vegetativos da planta apresentam-se na Tabela 13.

**Tabela 13.** Massas fresca (MF) e seca (MS) das folhas (F), pecíolos (P) e raízes (R) (média  $\pm$  erro padrão) dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução hidropônica (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>).

Dose K	MFF (g)	MFP (g)	MFR (g)	MSF (g)	MSP (g)	MSR (g)
<b>1,8</b>	31,2 $\pm$ 3,64c	22,5 $\pm$ 3,09b	25,7 $\pm$ 2,75a	7,21 $\pm$ 0,76c	3,37 $\pm$ 0,52b	5,06 $\pm$ 0,69ab
<b>4,2</b>	56,9 $\pm$ 3,17a	41,0 $\pm$ 2,39a	29,2 $\pm$ 2,18a	14,02 $\pm$ 0,83a	6,12 $\pm$ 0,32a	5,03 $\pm$ 0,40ab
<b>5,7</b>	46,1 $\pm$ 3,28abc	32,0 $\pm$ 3,57ab	28,3 $\pm$ 2,40a	11,55 $\pm$ 0,78ab	4,87 $\pm$ 0,49ab	6,12 $\pm$ 0,25a
<b>7,4</b>	37,4 $\pm$ 4,00bc	27,2 $\pm$ 2,67ab	24,1 $\pm$ 2,22a	8,99 $\pm$ 0,99b	3,96 $\pm$ 0,43ab	3,87 $\pm$ 0,67b
<b>9,8</b>	49,2 $\pm$ 4,63ab	41,0 $\pm$ 5,52a	27,7 $\pm$ 3,11a	12,12 $\pm$ 1,19ab	5,94 $\pm$ 0,80ab	4,60 $\pm$ 0,73ab

Médias e erro padrão médio seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os resultados mostram que o melhor desenvolvimento vegetativo em relação à produção de massa fresca do morangueiro, tanto na parte aérea, como na raiz foi obtido com a dose 4,2 mmol L<sup>-1</sup> de K. Observou-se também que a dose 1,8 mmol L<sup>-1</sup> de K comprometeu a acumulação da MFF e MFP.

Houve também efeito das doses de K sobre a produção de massa seca dos pecíolos, folhas e raízes e, tal como ocorreu para a massa fresca, a dose 4,2 mmol L<sup>-1</sup> de K foi a que proporcionou a maior acumulação de MSP e MSF e a dose mais baixa de K (1,8 mmol L<sup>-1</sup>) comprometeu a acumulação de MSP, MSF e MSR. É relatado na literatura que uma concentração adequada de K pode aumentar a acumulação total de massa seca das plantas (Egilla *et al.*, 2001). Reduções na produção de massas fresca e seca do morangueiro cv. Toyonoka foram também observadas por Mondal *et al.* (2017) ao testarem os efeitos de diferentes doses de KNO<sub>3</sub> sobre a solução nutritiva fornecida às plantas.

Além da baixa disponibilidade de K comprometer a produção de massa seca das plantas, por ser constituinte de até 10 % do seu valor (Wang e Wu, 2013), a deficiência de K está relacionada com a redução da condutância estomática. Esta deficiência prejudica a fixação de CO<sub>2</sub> pelas folhas, o que interrompe a conversão de energia luminosa em energia química no processo fotossintético (Cakmak, 2005).

Como foi verificado neste ensaio, na avaliação realizada na 24<sup>a</sup> semana após a transplantação, os morangueiros cultivados sob a menor dose de K (1,8 mmol L<sup>-1</sup>) apresentaram a menor g<sub>s</sub>12h, o que será provavelmente a causa da menor produção de biomassa fresca e seca nestas plantas.

Os resultados mostram que as diferentes doses de K influenciaram a produção de frutos pelos morangueiros (Tabela 14).



**Tabela 14.** Número e peso médio da produção de morangos cv. San Andreas (média ± erro padrão) por colheita em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>) por semana de colheita.

Dose K	Número de morangos	Peso médio (g fruto <sup>-1</sup> colheita <sup>-1</sup> )
<b>1,8</b>	8,8 ± 2,56ab	78,7 ± 24,08ab
<b>4,2</b>	9,3 ± 2,38ab	80,1 ± 18,95ab
<b>5,7</b>	17,0 ± 3,86a	137,7 ± 29,56a
<b>7,4</b>	12,7 ± 2,41ab	110,2 ± 22,37ab
<b>9,8</b>	6,9 ± 2,01b	41,7 ± 11,45b

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A dose controlo (5,7 mmol L<sup>-1</sup> de K) foi a que produziu o maior número e peso médio de morangos por colheita, sendo 60 % superior no número e 70 % superior no peso médio dos frutos, relativamente à produção obtida com a dose 9,8 mmol L<sup>-1</sup> de K, que promoveu o menor rendimento da cultura. Resultados similares para a redução da produção do morangueiro cv. San Andreas em função do aumento da concentração de iões na solução nutritiva foi observado por Sun *et al.* (2015), mesmo sendo esta cultivar, considerada por estes autores, como tolerante a valores de CE de 4,4 dS m<sup>-1</sup>.

A principal hipótese que pode explicar a redução observada na produção do morangueiro, por efeito da dose mais elevada de K (9,8 mmol L<sup>-1</sup>), baseia-se na absorção competitiva em relação ao somatório total de catiões no interior da planta, como demonstrado por Greenwood e Stone (1998). Estes autores relataram que a elevada concentração de K poderia induzir deficiências de outros catiões, como o Ca e o Mg, que se refletem na redução da produção de frutos pela planta. Resultados obtidos por Lieten (2006) confirmam esta hipótese. O autor observou uma redução no número, no tamanho e na produção de morangos no tratamento com a relação K:Ca:Mg mais elevada na solução nutritiva dos morangueiros. Andriolo *et al.* (2010) também observaram que a dose 9 mmol L<sup>-1</sup> de K na solução nutritiva das plantas reduziu o número médio de morangos produzidos.

A dose 4,2 mmol L<sup>-1</sup> de K foi a que apresentou a maior produção de biomassa fresca e seca das plantas (Tabela 13). No entanto, as plantas cultivadas nesta dose tiveram o rendimento em peso médio de morangos 58 % inferior à dose controlo (5,7 mmol L<sup>-1</sup> de K) e frutos com o menor teor em K (Figura 8).

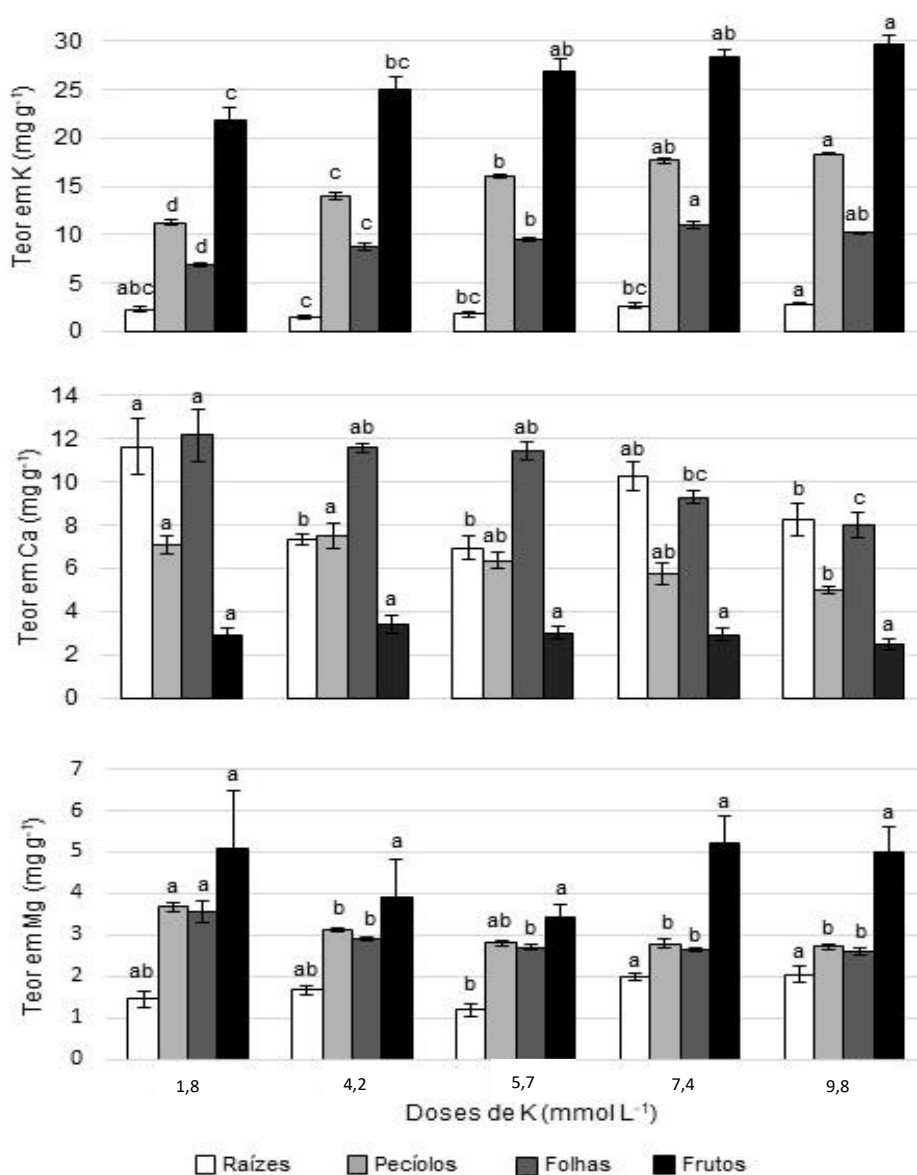
Comportamento semelhante ao deste ensaio foi observado por Mondal *et al.* (2017) e segundo estes autores, está relacionado com a adequação da dose de K para promover o equilíbrio entre de absorção deste elemento pelo morangueiro, na fase de desenvolvimento vegetativo e produção de frutos. Rengel e Damon (2008) também

afirmaram que a absorção de K pelas plantas pode ser alterada em função do estágio de desenvolvimento, principalmente na passagem dos estádios vegetativo para o reprodutivo.

### 3.1.2 Efeito das doses de potássio sobre o teor em K, Ca e Mg nos diferentes órgãos da planta e na parede celular dos morangos

#### 3.1.2.1 Teor em K, Ca e Mg na planta e nos frutos

Verificou-se neste ensaio que houve efeito das diferentes doses de K sobre o teor de K, Ca e Mg nos diferentes órgãos da planta (Figura 8).



**Figura 8.** Teor em K, Ca e Mg na massa seca dos diferentes órgãos da planta (raízes, pecíolos, folhas e frutos), em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>). Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,01).

Os valores de referência para os níveis adequados de nutrientes nas folhas do morangueiro no início da floração variam entre 11,0 a 25,0 mg g<sup>-1</sup> para o K, 5,0 a 15,0 mg g<sup>-1</sup> para o Ca e 2,5 a 4,5 mg g<sup>-1</sup> para o Mg (Campbell, 2000).

Os resultados mostram que o maior teor em K nas raízes, pecíolos, folhas e frutos foi observado com a dose mais elevada (9,8 mmol L<sup>-1</sup> de K). O teor de K nas folhas nesta dose foi inferior ao teor médio de 23,37 mg g<sup>-1</sup> obtido por Sun *et al.* (2015) nas folhas do morangueiro, após produção de frutos. Contudo, foi superior ao obtido por Antunes *et al.* (2014) para o fruto (18,34 mg g<sup>-1</sup>) da mesma cultivar utilizada neste ensaio.

Foi observado um comportamento linear crescente em função das diferentes doses de K para o teor deste elemento nos pecíolos, folhas e frutos. Era esperado que este comportamento ocorresse e possivelmente não foi evidente para as raízes por estas terem sido lavadas antes de serem analisadas. Isto deve-se ao facto do K ser um elemento altamente lavável nos tecidos externos da planta (Marschner, 2012).

Mondal *et al.* (2017) também observaram que com a redução da concentração de KNO<sub>3</sub> na solução nutritiva do morangueiro, o teor de K nas folhas, coroas e raízes diminuiu em aproximadamente 80 % em relação à dose controlo.

Para todas as doses de K estudadas neste ensaio, a acumulação deste catião nos diferentes órgãos da planta seguiu a sequência decrescente: frutos > folhas > pecíolos > raízes. Segundo Marschner (2012), uma sequência de acumulação de nutrientes nos diferentes órgãos vegetais em que os frutos apresentam o maior teor do nutriente e as raízes o menor, é característica de elementos altamente móveis no floema, como é o caso do K.

Ao contrário da relação de distribuição do K nas diferentes partes da planta, o Ca tende a concentrar-se em tecidos mais velhos, visto que possui baixa capacidade de redistribuição para os tecidos mais novos, como os frutos (Marschner, 2012).

Este comportamento de acumulação do Ca nos tecidos mais velhos das plantas foi observado neste ensaio. De facto, o teor de Ca nas raízes dos morangueiros da maioria dos tratamentos com as diferentes doses de K foi similar aos das folhas ou dos pecíolos e o menor teor deste elemento foi encontrado nos morangos (Figura 8).

Ao nível das raízes verificou-se que o maior teor de Ca ocorreu na dose mais baixa de K (1,8 mmol L<sup>-1</sup>). Segundo Marschner (2012), os grupos carboxilos dos

polissacarídeos de carga negativa das raízes funcionam como locais de ligação dos cátions da solução nutritiva e o  $\text{Ca}^{2+}$  é o cátion que preferencialmente se liga a estes grupos carboxilos. O mesmo autor refere ainda que a mobilidade do  $\text{K}^+$  através da membrana celular é bastante superior à mobilidade do  $\text{Ca}^{2+}$ . Assim, para as plantas da dose  $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$  de K, a rapidez de transporte do  $\text{K}^+$  através da membrana celular associada à baixa concentração deste cátion na solução nutritiva parece ter contribuído para a concentração mais elevada do  $\text{Ca}^{2+}$  nas raízes destes morangueiros. De igual modo à medida que as doses de  $\text{K}^+$  aumentaram na solução nutritiva, os efeitos da rapidez do transporte deste cátion ao nível das membranas não foram tão evidentes e o teor de Ca nas raízes diminuiu, provavelmente pela ligação da  $\text{K}^+$  ocupar os locais de ligação que poderiam ser ocupados pelo  $\text{Ca}^{2+}$ .

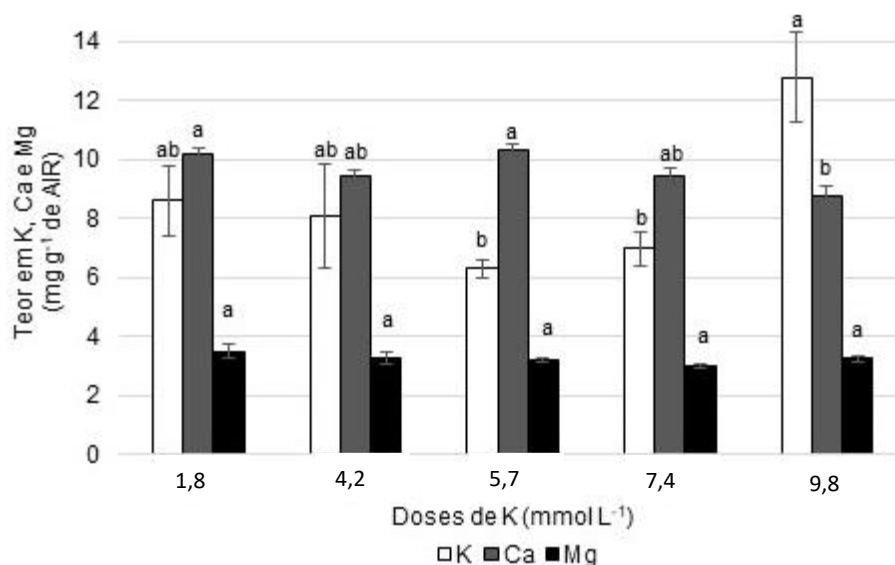
Apesar dos teores de Mg nas folhas estarem dentro do intervalo adequado proposto por Campbell (2000), o mesmo comportamento para o teor de Ca foi observado para o teor de Mg nas folhas e pecíolos em função das diferentes doses de K (Figura 8). Provavelmente, estes resultados devem-se ao antagonismo característico verificado entre magnésio e potássio (Marschner, 2012). Segundo Meurer (2006), o incremento da concentração de K na solução nutritiva tem efeito depressivo na absorção de magnésio, enquanto o inverso não ocorre.

A relação de antagonismo entre o K e o Ca e Mg, verificada na capacidade de acumulação desses cátions nos tecidos das plantas sob o efeito de doses crescentes de K adicionadas na solução nutritiva, foi observada neste ensaio. Em função do aumento das doses de K na solução nutritiva, o teor de K nas raízes, pecíolos e folhas aumentou, enquanto o teor Ca e Mg nos mesmo órgãos diminuiu. O mesmo comportamento para a relação K:Ca:Mg foi observado por Mondal *et al.* (2017) nas folhas do morangueiro submetido a doses crescente de  $\text{KNO}_3$ .

Consequentemente, a dose mais baixa de K ( $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ) favoreceu a absorção e acumulação de Ca e Mg nos órgãos vegetativos da planta. O teor mais elevado de Ca nas folhas ( $12,15 \text{ mg g}^{-1}$ ), obtido com a dose  $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$  de K foi próximo do obtido por Sun *et al.* (2015) para a mesma cultivar usada neste ensaio ao trabalharem com diferentes CE na solução nutritiva. Estes autores observaram que em condições de baixa CE, igual a  $1,1 \pm 0,1 \text{ dS m}^{-1}$ , com a concentração mais baixa de K na solução nutritiva, o teor de cálcio nas folhas foi de  $13,85 \text{ mg g}^{-1}$ . Mondal *et al.* (2017) ao reduzirem a concentração de  $\text{KNO}_3$  na solução nutritiva do morangueiro, observaram que houve um acréscimo no teor de Mg nas folhas, como no presente ensaio. Estes autores também não encontraram efeito significativo das diferentes doses de K sobre o teor deste nutriente nos frutos.

### 3.1.2.2 Teor em K, Ca e Mg na parede celular dos morangos

Os resultados obtidos para o teor de K, Ca e Mg na parede celular (AIR) dos morangos encontram-se na Figura 9. Assim como nos morangos liofilizados, não houve efeito das doses de K para o teor em Mg; contudo, houve efeito sobre o teor de K e Ca no AIR.



**Figura 9.** Teor em K, Ca e Mg na parede celular dos morangos (média  $\pm$  erro padrão), em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>). Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O Ca foi o nutriente em maior concentração na parede celular dos frutos da maioria dos tratamentos com as diferentes doses de K. Isto deve-se ao facto de cerca de 60 % do Ca<sup>2+</sup> celular se encontrar na parede celular, especialmente na região da lamela média (Hanson *et al.*, 1993), sendo o constituinte mineral de maior predominância neste tecido.

A dose mais elevada de K (9,8 mmol L<sup>-1</sup>) parece ter influenciado o teor em Ca no AIR dos frutos, apresentando um teor em Ca significativamente inferior em comparação com as restantes doses de K estudadas. Esta ocorrência pode estar relacionada com a influência que a ligação de Ca na parede celular sofre pelo efeito da pressão de turgescência da célula (Boyer, 2009), que pode ter sido promovido pelo excesso de K. Segundo Hepler e Winship (2010) quando os pectatos de Ca são submetidos a tensão física, como as impostas pela pressão de turgescência de 0,2 MPa, as ligações podem ser enfraquecidas e diminuir a afinidade das ligações de Ca<sup>2+</sup>.

A diminuição do teor de Ca na parede celular na presença de excesso de K na solução nutritiva pode ainda ter origem na influência do íon  $K^+$  no potencial de membrana das células vegetais. O potencial de membrana hiperpolarizado é a principal força motriz que favorece a absorção de  $Ca^{2+}$  do meio de crescimento das plantas contra o gradiente de concentração de  $Ca^{2+}$  na raiz (Wang, 2013). Quando a concentração de  $K^+$  na solução nutritiva é baixa, o processo de hiperpolarização da membrana aumenta, e consequentemente, favorece a absorção de  $Ca^{2+}$  (Nieves-Cordones *et al.*, 2008). No entanto, quando a concentração de  $K^+$  na solução nutritiva é elevada, ocorre a despolarização do potencial de membrana (Spalding *et al.*, 1999). Consequentemente, a absorção de  $Ca^{2+}$  é influenciada, podendo este processo de despolarização da membrana plasmática desencadear fenômenos de redistribuição do  $Ca^{2+}$  ao nível celular e levar à deficiência deste nutriente nos tecidos vegetais.

### 3.1.3 Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste ensaio conclui-se que as doses de K adicionadas à solução nutritiva em sistema hidropônico contendo areia não foram suficientes para causar sintomas de deficiência, de toxicidade, nem efeitos negativos no estado hídrico dos morangueiros cv. San Andreas.

A baixa disponibilidade de K na solução nutritiva dificultou o processo de abertura estomática e causou uma redução no teor de K nos diferentes órgãos da planta.

Tanto a baixa disponibilidade, quanto o excesso de K na solução nutritiva causaram uma drástica redução na produção de morangos, além do excesso de K ter tido efeito negativo para a acumulação de biomassa fresca e seca das folhas.

O aumento das doses de K reduziu a acumulação de Ca nos pecíolos e folhas do morangueiro, apesar das doses não terem tido efeito negativo no teor de Ca total nos frutos. No entanto, quando se avaliou o teor de cálcio presente no AIR dos frutos tornou-se mais visível o efeito que o excesso de potássio na solução nutritiva teve na redução do Ca da parede celular.

Os resultados sugerem que, apesar de nenhuma das doses de K estudadas na solução nutritiva do morangueiro impedir a produção, a dose recomendada (5,7 mmol  $L^{-1}$  de K) é a que proporciona a melhor produção de frutos para a cv. San Andreas em sistema hidropônico contendo areia nas condições em foi conduzido este ensaio.

## 3.2 Ensaio II – Utilização do sistema hidropônico do tipo NGS® contendo substrato orgânico comercial

### 3.2.1 Efeito das doses de potássio na fisiologia das plantas, na produção e na qualidade dos frutos

#### 3.2.1.1 Fisiologia

Os resultados obtidos para o índice SPAD na folha jovem (SPAD FJ) e adulta (SPAD FA), para o índice de desempenho da fotossíntese ( $PI_{abs}$ ) e para a máxima eficiência quântica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), nas avaliações realizadas na 15ª e 33ª semana após a transplantação dos morangueiros, apresentam-se na Tabela 15.

**Tabela 15.** Índice SPAD nas folhas jovens (FJ) e adultas (FA), índice de desempenho da fotossíntese ( $PI_{abs}$ ) e máxima eficiência quântica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) (média  $\pm$  erro padrão) avaliados na 15ª semana (1ª avaliação) e 33ª semana (2ª avaliação) após a transplantação dos morangueiros cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>).

15ª semana após a transplantação dos morangueiros (1ª Avaliação)				
Dose K	SPAD FJ	SPAD FA	$PI_{abs}$	$F_v/F_m$
2,15	50,5 $\pm$ 1,13a	58,1 $\pm$ 0,71a	8,6 $\pm$ 0,77a	0,80 $\pm$ 0,004a
4,15	52,1 $\pm$ 1,29a	58,3 $\pm$ 0,81a	8,8 $\pm$ 0,84a	0,80 $\pm$ 0,004a
6,15	51,2 $\pm$ 1,10a	59,1 $\pm$ 0,86a	8,7 $\pm$ 0,83a	0,80 $\pm$ 0,006a
8,15	53,5 $\pm$ 1,18a	58,9 $\pm$ 0,74a	9,6 $\pm$ 0,86a	0,80 $\pm$ 0,006a
10,15	53,3 $\pm$ 0,91a	57,7 $\pm$ 0,67a	8,9 $\pm$ 0,80a	0,79 $\pm$ 0,004a
33ª semana após a transplantação dos morangueiros (2ª Avaliação)				
Dose K	SPAD FJ	SPAD FA	$PI_{abs}$	$F_v/F_m$
2,15	35,5 $\pm$ 1,69b	42,6 $\pm$ 2,20b	5,1 $\pm$ 0,79b	0,79 $\pm$ 0,009b
4,15	39,8 $\pm$ 2,07ab	49,28 $\pm$ 1,83a	6,9 $\pm$ 0,98ab	0,81 $\pm$ 0,005a
6,15	42,1 $\pm$ 1,54a	50,01 $\pm$ 0,87a	8,7 $\pm$ 0,79ab	0,81 $\pm$ 0,005a
8,15	39,8 $\pm$ 1,27ab	51,83 $\pm$ 1,09a	9,0 $\pm$ 1,52a	0,81 $\pm$ 0,007a
10,15	41,4 $\pm$ 1,32ab	50,99 $\pm$ 1,13a	9,3 $\pm$ 0,91a	0,82 $\pm$ 0,003a

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Dentro de um intervalo de 0 a 100, quanto maior é a leitura SPAD maior é a intensidade da cor verde da folha. Porém, segundo El-Jendoubi *et al.* (2011), valores superiores a 60 resultam da saturação do aparelho pela leitura em folhas muito espessas ou opacas, não sendo estes valores fiáveis para concluir o estado nutricional da planta.

As diferentes doses de K não afetaram o índice SPAD nas folhas jovens (SPADFJ) e adultas (SPADFA) avaliadas na 15ª semana após a transplantação dos morangueiros. Na segunda avaliação (33ª semana após a transplantação dos morangueiros), os valores de SPADFJ e SPADFA foram inferiores em comparação com os valores da avaliação anterior.

Para todas as plantas deste ensaio, independentemente da dose de K, não foram observadas anomalias na coloração das folhas. No entanto, a dose mais baixa (2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K) promoveu a redução nos valores de SPAD, tanto nas folhas jovens (SPADFJ), como nas folhas adultas (SPADFA).

Palencia *et al.* (2015) sugeriram que os valores de SPAD variariam durante o ciclo de cultivo da cv. Primoris e observaram valores de SPAD médios de 50 e 55 avaliados na 12ª e 24ª semanas após a transplantação dos morangueiros, respetivamente. Diversos autores relataram que variações nos valores deste índice podem ocorrer em função do estágio fenológico, do ciclo e das condições de cultivo da cultura (El-Jendoubi *et al.*, 2011; Pestana *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2017).

Neste ensaio, correlações positivas foram encontradas entre o teor de clorofilas estimado através do índice SPAD e o índice mensurado a partir da fluorescência das clorofilas, PI<sub>abs</sub> ( $r = 0,55$ ;  $p \leq 0,01$ ), ambos medidos nas mesmas folhas (folhas jovens) na 15ª semana após a transplantação dos morangueiros. Correlações positivas entre estes índices medidos nas folhas jovens do morangueiro foram também encontradas no ensaio I deste capítulo e por outros autores na espécie *Atriplex nummularia* (Melo *et al.*, 2017).

A determinação da fluorescência das clorofilas fornece informações básicas sobre o mecanismo fotossintético e tem sido utilizada para detetar mudanças no fotossistema II que ocorrem nas plantas sob condições de *stress*, através do PI<sub>abs</sub> e F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> (Yamane *et al.*, 2000). Segundo Melo *et al.* (2017), a redução dos valores obtidos é o comportamento normal para o índice de desempenho da fotossíntese (PI<sub>abs</sub>) e a máxima eficiência quântica do fotossistema II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) pelas plantas em resposta ao *stress* salino.

Os parâmetros PI<sub>abs</sub> e F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> estão significativamente correlacionados com as doses de K. Além disso, os resultados destes índices (PI<sub>abs</sub> e F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) correlacionarem-se positivamente entre si na avaliação realizada na 15ª semana ( $r = 0,74$ ;  $p \leq 0,01$ ) e na 33ª semana ( $r = 0,81$ ;  $p \leq 0,01$ ) após a transplantação dos morangueiros.

Na avaliação realizada na 33ª semana após a transplantação dos morangueiros, os valores destes parâmetros tenderam a aumentar em função das doses crescentes de K. A dose mais baixa de K (2,15 mmol L<sup>-1</sup>) foi significativamente deletéria ao PI<sub>abs</sub> e ao F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, sugerindo que houve um *stress* decorrente da baixa disponibilidade de K



nestas plantas. No entanto, segundo estudo realizado por Shu *et al.* (2013), o valor de  $F_v/F_m$  para plantas submetidas a condições de *stress* é normalmente abaixo de 0,75 e valores entre 0,79 a 0,84 são considerados ótimos por Maxwell e Johnson (2000) para a maioria das espécies de plantas. Assim, com base nestes valores de referência, nas duas avaliações realizadas (15<sup>a</sup> e 33<sup>a</sup> semana após a transplantação dos morangueiros), as diferentes doses de K não parecem ter causado danos ao mecanismo fotossintético das plantas.

Os resultados mostram que as diferentes doses de K influenciam significativamente a condutância estomática das folhas avaliadas tanto às 10 ( $g_s10h$ ) quanto às 12 horas ( $g_s12h$ ) nas duas avaliações realizadas nos morangueiros (Tabela 16).

**Tabela 16.** Condutância estomática às 10h ( $g_s10h$ ) e 12h ( $g_s12h$ ), temperatura da folha às 10h ( $tF10h$ ) e 12h ( $tF12h$ ) e potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) na primeira e segunda avaliação (média  $\pm$  erro padrão) avaliados na 15<sup>a</sup> semana (1<sup>a</sup> avaliação) e 33<sup>a</sup> semana (2<sup>a</sup> avaliação) após a transplantação dos morangueiros cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>).

15 <sup>a</sup> semana após a transplantação dos morangueiros (1 <sup>a</sup> Avaliação)					
Dose K	$g_s10h$ (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$g_s12h$ (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$tF10h$ (°C)	$tF12h$ (°C)	$\Psi_w$ (MPa)
<b>2,15</b>	234 $\pm$ 11,4ab	240 $\pm$ 11,4ab	19,64 $\pm$ 1,33a	25,28 $\pm$ 0,9a	-1,12 $\pm$ 0,04a
<b>4,15</b>	210 $\pm$ 9,2ab	234 $\pm$ 15,9b	19,86 $\pm$ 1,27a	25,15 $\pm$ 1,0a	-1,1 $\pm$ 0,03a
<b>6,15</b>	238 $\pm$ 8,2a	225 $\pm$ 6,0b	21,05 $\pm$ 1,24a	25,72 $\pm$ 0,9a	-1,12 $\pm$ 0,05a
<b>8,15</b>	241 $\pm$ 7,6a	278 $\pm$ 15,4a	20,94 $\pm$ 1,26a	24,64 $\pm$ 1,0a	-1,08 $\pm$ 0,05a
<b>10,15</b>	197 $\pm$ 11,9b	243 $\pm$ 14,4ab	21,99 $\pm$ 1,09a	24,72 $\pm$ 1,0a	-1,05 $\pm$ 0,04a
33 <sup>a</sup> semana após a transplantação dos morangueiros (2 <sup>a</sup> Avaliação)					
Dose K	$g_s10h$ (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$g_s12h$ (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$tF10h$ (°C)	$tF12h$ (°C)	$\Psi_w$ (MPa)
<b>2,15</b>	172 $\pm$ 19,2a	145 $\pm$ 22,1b	28,67 $\pm$ 0,61a	36,34 $\pm$ 0,3a	-1,51 $\pm$ 0,08a
<b>4,15</b>	170 $\pm$ 10,2a	225 $\pm$ 29,4ab	28,36 $\pm$ 0,60a	35,10 $\pm$ 0,4ab	-1,66 $\pm$ 0,10ab
<b>6,15</b>	158 $\pm$ 19,3ab	239 $\pm$ 39,1a	29,41 $\pm$ 1,62a	33,34 $\pm$ 0,5c	-1,73 $\pm$ 0,11ab
<b>8,15</b>	162 $\pm$ 14,4ab	122 $\pm$ 15,2b	28,15 $\pm$ 0,51a	34,94 $\pm$ 0,4ab	-1,98 $\pm$ 0,13b
<b>10,15</b>	194 $\pm$ 8,9a	217 $\pm$ 27,2ab	28,29 $\pm$ 0,40a	33,66 $\pm$ 0,3bc	-1,79 $\pm$ 0,06ab

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os valores da  $g_s10h$  na 1<sup>a</sup> avaliação (15<sup>a</sup> semana após a transplantação do morangueiro) foram relativamente próximos em todas as doses de K, mais decresceram significativamente nas plantas regadas com a doses 10,15 mmol L<sup>-1</sup> de K. Na  $g_s12h$ , a dose controle (6,15 mmol L<sup>-1</sup> de K) apresentou o menor valor de  $g_s12h$ , sendo a dose

8,15 mmol L<sup>-1</sup> de K a que apresentou o maior valor para este parâmetro. Houve correlação positiva entre os valores obtidos na g<sub>s</sub>10h e g<sub>s</sub>12h (r = 0,21; p ≤ 0,05).

Na 33ª semana após a transplantação dos morangueiros, foi observado, para a condutância estomática medida às 10 (g<sub>s</sub>10h) e às 12 horas (g<sub>s</sub> 12h), um comportamento inverso ao da 1ª avaliação (15ª semana após a transplantação dos morangueiros). Os valores de g<sub>s</sub>10h reduziram em função do aumento das doses de K até a dose 8,15 mmol L<sup>-1</sup>, tendo a dose mais elevada de K (10,15 mmol L<sup>-1</sup>) promovido o aumento no valor deste parâmetro e, para os valores de g<sub>s</sub>12h, a dose controlo (6,15 mmol L<sup>-1</sup> de K) apresentou o maior valor.

Apesar da interação de diversos fatores ambientais, tais como luz, temperatura e humidade relativa do ar que atuam sobre a abertura e o fecho dos estomas e, conseqüentemente, sobre a condutância estomática, ficou evidente o efeito das doses de K sobre esse parâmetro. As plantas dependem de K para regular a abertura e o fecho dos estomas, o que é essencial para a fotossíntese, para o transporte de água e nutrientes e o arrefecimento das plantas (Mengel, 2007).

Nas condições ambientais da 1ª avaliação (15 semanas após a transplantação dos morangueiros), a dose controlo (6,15 mmol L<sup>-1</sup>) foi eficiente em promover a abertura estomática às 10 horas e ao fecho estomático no período com temperatura mais elevada (12h), favorecendo a manutenção da hidratação das plantas. Na segunda avaliação (33ª semanas após a transplantação dos morangueiros), este comportamento não foi observado para a dose controlo (6,15 mmol L<sup>-1</sup>), ocorrendo o aumento da abertura estomática às 12 horas. O facto de neste dia a temperatura máxima no interior da estufa ter sido amena (28,6°C) e não ter havido temperaturas superiores a esta antes da avaliação da g<sub>s</sub>12h, pode ter contribuído para a manutenção da abertura estomática da maioria das plantas das diferentes doses de K a esta hora, na avaliação realizada na 33ª semana após a transplantação dos morangueiros.

Segundo Hikosaka *et al.* (2006), as plantas aclimatam-se à temperatura do ambiente, alterando as suas respostas aos parâmetros relacionados com a fotossíntese. Quando as plantas são cultivadas sob temperaturas elevadas, a temperatura ótima para a fotossíntese torna-se maior e o inverso ocorre para as temperaturas mais baixas. Assim, a temperatura da folha está relacionada com a temperatura do ar e as plantas não submetidas a condições de *stress* conseguem manter a temperatura foliar inferior à do ar (Jun *et al.*, 2017).

Na avaliação realizada na 15ª semana após a transplantação, não houve efeito das diferentes doses de K sobre a temperatura das folhas medidas às 10 (tF10h) e às 12 horas (tF12h) e sobre o potencial hídrico (Ψ<sub>w</sub>). Na 2ª avaliação (33ª semana após a

transplantação dos morangueiros), as diferentes doses de K também não afetaram a tF10h; no entanto, houve efeito destas doses sobre a tF12h e sobre o  $\Psi_w$ .

A temperatura das folhas está negativamente relacionada com a transpiração (Morales *et al.*, 2015), que é um dos principais mecanismos de arrefecimento das plantas. Neste ensaio, este comportamento foi observado quando se correlacionou a tF com a  $g_s$ . As respostas das plantas às condições ambientais foram confirmadas através das correlações negativas entre a tF12h e a  $g_s$ 12h ( $r = -0,38$ ;  $p \leq 0,05$ ), na avaliação da 15ª semana e entre a tF12h e a  $g_s$ 12h ( $r = -0,39$ ;  $p \leq 0,05$ ), na 33ª semana após a transplantação dos morangueiros.

As diferentes doses de K exerceram pouco efeito sobre a temperatura das folhas (tF). Na 33ª semana após a transplantação dos morangueiros, a tF12h foi significativamente influenciada pela dose mais baixa de K ( $2,15 \text{ mmol L}^{-1}$ ), que apresentou folhas com temperaturas mais altas, e pela dose controlo ( $6,15 \text{ mmol L}^{-1}$ ), que apresentou folhas com temperaturas mais baixas na avaliação realizada na 33ª semana após a transplantação dos morangueiros.

Não foi observado efeito das diferentes doses de K sobre o  $\Psi_w$  dos morangueiros avaliados na 15ª semana após a transplantação. Variações nos valores deste potencial foram observadas na 2ª avaliação (33ª semana após a transplantação dos morangueiros), em que estes valores foram o menos e o mais negativo na dose  $2,15 \text{ mmol L}^{-1}$  de K e  $8,15 \text{ mmol L}^{-1}$  de K, respetivamente.

As respostas das plantas para os valores de  $\Psi_w$  menos negativos na 1ª avaliação e mais negativos na 2ª avaliação podem estar relacionadas com a fase de desenvolvimento em que aquelas foram avaliadas e com as condições atmosféricas no dia da avaliação. Mesmo observando que as doses  $2,15$  e  $8,15 \text{ mmol L}^{-1}$  de K influenciaram o valor do  $\Psi_w$ , estas doses não foram suficientes para alterar a capacidade hídrica das plantas, pois segundo Grant *et al.* (2010), os valores do  $\Psi_w$  nos morangueiros podem alcançar valores entre  $-2,0$  e  $-0,8 \text{ MPa}$  sem serem deletérias à condição hídrica das plantas.

Não foi observado efeito das diferentes doses de K sobre a percentagem de água ( $\%H_2O$ ) das folhas e pecíolos e sobre o conteúdo relativo em água (RWC) dos folíolos (Tabela 17).

**Tabela 17.** Percentagem de água (%H<sub>2</sub>O) das folhas e pecíolos, conteúdo relativo em água dos folíolos (RWC) e área específica dos folíolos (SLA) (média ± erro padrão) do morangueiro cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>).

Dose K	%H <sub>2</sub> O Folhas	%H <sub>2</sub> O Pecíolos	RWC (%)	SLA (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )
<b>2,15</b>	0,67 ± 0,002a	0,80 ± 0,027a	0,91 ± 0,03a	12,7 ± 0,44b
<b>4,15</b>	0,68 ± 0,007a	0,79 ± 0,008a	0,83 ± 0,02a	16,5 ± 1,06a
<b>6,15</b>	0,67 ± 0,006a	0,77 ± 0,008a	0,86 ± 0,03a	13,2 ± 1,83ab
<b>8,15</b>	0,67 ± 0,006a	0,78 ± 0,006a	0,83 ± 0,03a	14,2 ± 0,66a
<b>10,15</b>	0,68 ± 0,003a	0,79 ± 0,004a	0,84 ± 0,01a	15,0 ± 0,75a

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

O RWC e a %H<sub>2</sub>O nas diferentes partes vegetativas das plantas são consideradas medições alternativas do estado hídrico das plantas, refletindo a atividade metabólica nos tecidos vegetais (Kirkham, 2014).

Os resultados obtidos neste ensaio para estes parâmetros indicam que nem a redução e nem o excesso de K na solução nutritiva dos morangueiros afetaram as condições hídricas das plantas. Resultados semelhantes aos deste ensaio foram encontrados por Yaghubi *et al.* (2016), ao avaliarem o efeito da aplicação de doses crescentes de K sobre o RWC de duas cultivares do morangueiro. Segundo estes autores, as diferentes doses de K não alteraram o valor do RWC nas duas cultivares, que foi em média 0,85 %.

Houve efeito das diferentes doses de K sobre a área específica dos folíolos (SLA). A dose 2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K promoveu uma redução significativa da SLA quando comparada com a SLA das demais doses de K (Tabela 17).

A redução na SLA nos morangueiros pode estar relacionada com o facto da fonte de N utilizada na formulação desta dose não possuir o nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>), como pode ser visualizado na Tabela 13, sendo que esta é a principal fonte de N e K sugerida na literatura para a cultura do morangueiro. O azoto (N) é o nutriente exigido em maior quantidade para o crescimento e desenvolvimento das culturas (Miller e Cramer, 2005). Além do N, o K é o nutriente exigido em maior quantidade pelas plantas, constituindo até 10 % da sua matéria seca (Leigh e Wyn Jones, 1984; Leigh, 2001).

A menor produção de massas fresca e seca das folhas dos morangueiros também foi obtida com a dose 2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K (Tabela 18). A redução da SLA e das massas fresca e seca das folhas dos morangueiros foi observado também por Mondal *et al.* (2017), quando os morangueiros foram cultivados com 1/32 da dose de KNO<sub>3</sub> recomendada na solução nutritiva. Segundo Jordan-Meille e Pellerin (2004), esta

redução da biomassa devido à deficiência de K é muitas vezes decorrente da redução na área foliar das plantas.

### 3.2.1.2 Biomassa e produção de frutos

Os resultados obtidos para a produção de biomassa fresca e seca pelos diferentes órgãos vegetativos das plantas apresentam-se na Tabela 18.

**Tabela 18.** Massas fresca (MF) e seca (MS) das folhas (F) e pecíolos (P) (média ± erro padrão) do morangueiro cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>).

Dose K	MFF(g)	MFP(g)	MSF(g)	MSP(g)
<b>2,15</b>	11,2 ± 3,34b	5,1 ± 3,13b	3,71 ± 1,13b	1,11 ± 0,36b
<b>4,15</b>	19,0 ± 7,71a	9,5 ± 4,23a	5,98 ± 2,38a	1,93 ± 0,82a
<b>6,15</b>	17,2 ± 7,51a	6,5 ± 3,05ab	5,69 ± 2,42a	1,47 ± 0,66a
<b>8,15</b>	18,9 ± 6,09a	7,1 ± 3,13ab	6,30 ± 2,15a	1,62 ± 0,76a
<b>10,15</b>	25,7 ± 2,93a	10,8 ± 1,70a	8,20 ± 0,88a	2,27 ± 0,32a

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A produção de MF e MS das folhas e pecíolos aumentou em função das doses crescentes de K a partir da dose 4,15 mmol L<sup>-1</sup>. Comparando a MF da parte aérea (folhas e pecíolos) obtida na dose 2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K com a média das demais doses (4,15; 6,15; 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup> de K), a redução foi de 42,8; 31,2; 62,7 e 55,3 % e na MS da parte aérea foi de 39,1; 32,7; 39,15 e 53,97 %, respetivamente às doses de K. Um resultado inverso foi observado para a peso médio dos frutos, em que a dose 2,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup> de K foram as que produziram frutos com maior (15,80 g fruto<sup>-1</sup>) e menor (13,75 g fruto<sup>-1</sup>) peso médio, respetivamente (Tabela 19).

Quando se analisam os órgãos aéreos (folhas, pecíolos e frutos) separadamente, revela-se que os frutos são os órgãos consumidores de assimilados mais importantes nas plantas (Reekie *et al.*, 2007). Esta provavelmente foi a causa de ter havido reduções significativas entre a produção de biomassa fresca e seca das folhas e pecíolos e maior número e peso médio dos frutos na dose 2,15 mmol L<sup>-1</sup> (Tabela 19).

**Tabela 19.** Número e peso médio da produção de morangos (média  $\pm$  erro padrão) por colheita em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>) por semana de colheita.

Dose K	Número de morangos	Peso médio (g frutos <sup>-1</sup> colheita <sup>-1</sup> )
<b>2,15</b>	13,1 $\pm$ 2,86a	207,2 $\pm$ 42,86a
<b>4,15</b>	7,57 $\pm$ 1,24b	113,0 $\pm$ 18,88c
<b>6,15</b>	9,86 $\pm$ 1,04a	149,4 $\pm$ 18,54b
<b>8,15</b>	7,64 $\pm$ 1,56b	114,5 $\pm$ 21,15c
<b>10,15</b>	10,29 $\pm$ 1,58a	141,5 $\pm$ 18,43b

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Apesar da dose 10,15 mmol L<sup>-1</sup> de K ter produzido os frutos de menor peso individual (13,75  $\pm$  0,6 g), as doses 4,15 e 8,15 mmol L<sup>-1</sup> de K foram as menos produtivas em número e peso médio de frutos (Tabela 19). É pouco provável que estas variações tenham ocorrido por efeito das diferentes doses de K afetarem a emissão de inflorescências, uma vez que esta é uma variável associada principalmente com a temperatura do ar e fotoperíodo. A menor produção de frutos nas doses acima de 2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K pode ser atribuída ao aborto prematuro das flores, resultante de perturbações na absorção de Ca e Mg induzidas pelo K, como observado por Andriolo *et al.* (2010).

A concentração 2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K na solução nutritiva para o cultivo do morangueiro foi proposta somente por Paranjpe *et al.* (2003). Nas principais recomendações formuladas para a cultura, esta concentração é considerada extremamente baixa, como pode ser visualizado na Tabela 1 do Capítulo I. No entanto, é provável que esta dose tenha sido a mais produtiva devido ao efeito da formação de uma zona de acumulação de nutrientes em torno das raízes, libertando o K gradativamente às plantas. Este efeito provavelmente foi devido ao facto do substrato orgânico utilizado ser composto por proporções iguais de perlite e fibra de coco, em que o primeiro material é caracterizado como um material inerte sem capacidade de troca catiónica (CTC) e o segundo, a fibra de coco, apresentar CTC. Segundo Ebrahimi *et al.* (2012), a combinação de fibra de coco e perlita no substrato apresenta elevada capacidade de troca catiónica.

Devido à formação desta zona com acumulação de sais, o decréscimo no número de frutos com o aumento da dose de K na solução nutritiva pode estar relacionado com o efeito da salinidade no substrato, causado pelas doses elevadas do fertilizante potássico. Como confirmação deste efeito, Karlidag *et al.* (2009) descrevem

que o morango é considerado uma espécie sensível à salinidade e é negativamente afetado pelo *stress* salino em termos de crescimento e de produção. Andriolo *et al.* (2010) também afirmam que o excesso de K se mostrou prejudicial à produção e qualidade dos morangos.

### **3.2.1.3 Efeito das doses de potássio sobre os atributos da qualidade físico-química em morangos**

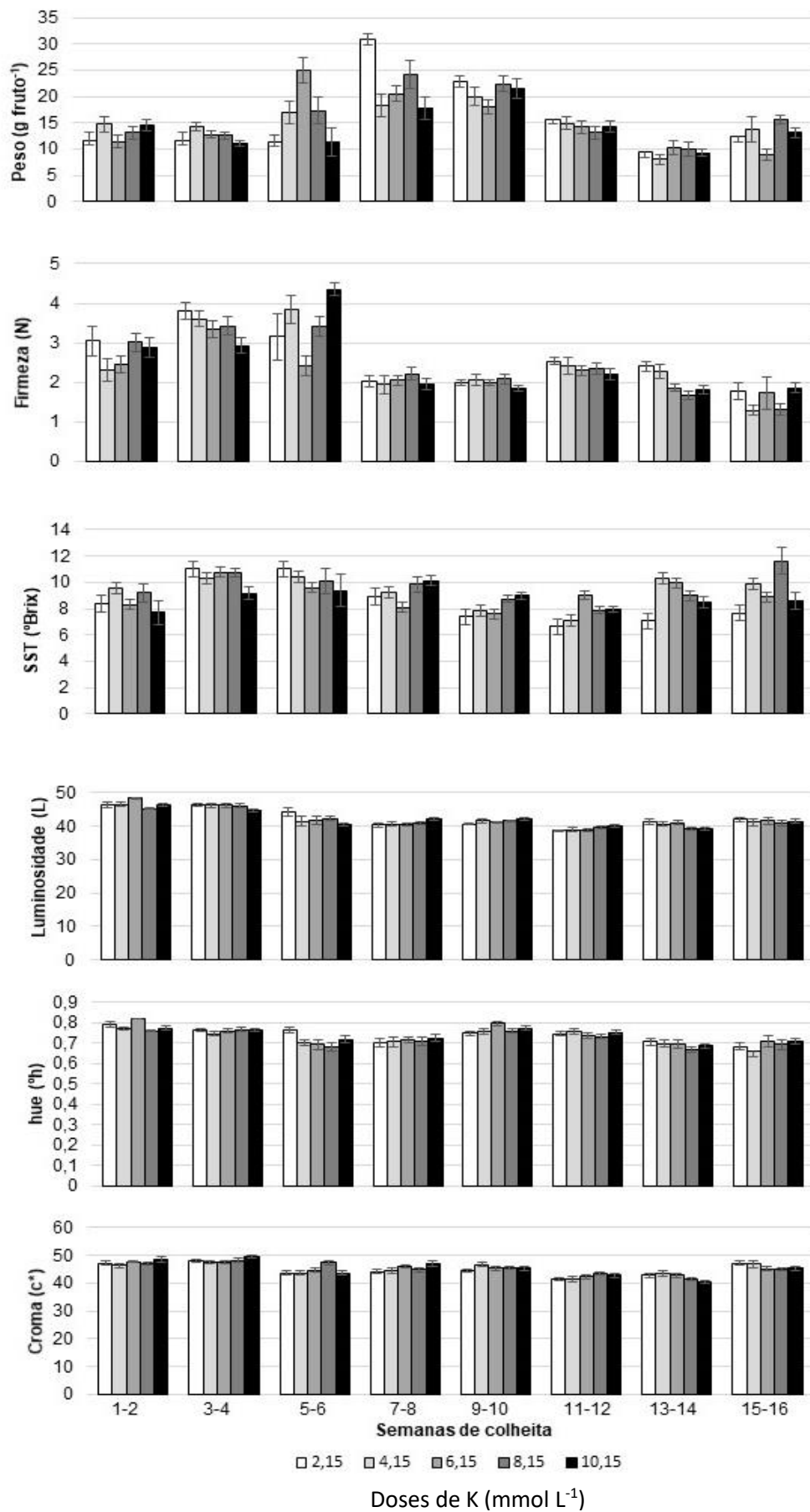
Os parâmetros relacionados com a qualidade dos frutos foram determinados a cada 2 semanas durante as 16 semanas de colheita. A evolução ao longo das colheitas em função das diferentes doses de K, pode ser visualizada na Figura 10.

As diferentes doses de K parecem não causar alterações na cor dos frutos ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $C^*$ ). No entanto, para o peso, a firmeza e os sólidos solúveis totais (SST), notam-se que ocorreram algumas variações ao longo do período de produção dos morangos.

Os frutos mais pesados foram produzidos em geral entre a terceira e a sexta semana de colheita, para todas as diferentes doses de K estudadas. Os frutos foram mais firmes durante as seis primeiras semanas de colheita (semana 1 a 6) para todas as doses de K. Os resultados sugerem que após a sexta semana de colheita do morangueiro cv. Primoris, a firmeza dos frutos apresenta uma redução que se mantém até o final do ciclo produtivo da planta independentemente das doses de K.

Os SST apresentam variações ao longo do período de colheita e estas variações apresentam padrões ligeiramente diferentes em função das diferentes doses de K. Em geral, os SST foram maiores nas 8 primeiras semanas de colheita (semana 1 a 8), reduzem-se ou mantem-se estáveis até à décima segunda colheita e voltam a aumentar até à última semana de produção.

Estas variações nos parâmetros da qualidade relacionadas com o peso, firmeza e SST revelam um comportamento normal dos frutos, que podem ocorrer devido a partição de fotoassimilados pela planta, pois os açúcares sintetizados nas folhas são translocados para os frutos numa relação fonte-dreno. Esta produção de assimilados, além de ser dependente da disponibilidade de nutrientes no meio de crescimento é também altamente dependente das condições ambientais, principalmente de luz e temperatura (Taiz e Zeiger, 2012).





**Figura 10.** Evolução do peso médio dos frutos, da firmeza (N), dos sólidos solúveis totais (SST), da luminosidade (L\*), do ângulo hue (°h) e do croma (C\*) (média e erro padrão) ao longo das semanas de colheita dos morangos cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>).

Apesar da observação destas variações globais, em função das semanas de colheita nos parâmetros da qualidade avaliados nos morangos, verificou-se que não houve diferenças estatísticas significativas no peso, firmeza, luminosidade (L\*), ângulo hue (°h), croma (C\*) (Tabela 20) e potencial hidrogeniônico (pH) (Tabela 21) nos morangos, em função das diferentes doses de K.

**Tabela 20.** Peso, sólidos solúveis totais (SST), firmeza, luminosidade (L\*), ângulo hue (°h) e croma (C\*) dos morangos (média ± erro padrão) em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>).

Dose	Peso (g fruto <sup>-1</sup> )	SST (°Brix)	Firmeza (N)	L*	Ângulo hue (°h)	Croma (C*)
<b>2,15</b>	15,85 ± 0,60a	7,82 ± 0,18b	2,55 ± 0,07a	41,30 ± 0,27a	0,74 ± 0,005a	44,01 ± 0,29a
<b>4,15</b>	14,93 ± 0,62a	8,96 ± 0,26a	2,63 ± 0,10a	41,97 ± 0,35a	0,74 ± 0,006a	44,94 ± 0,41a
<b>6,15</b>	15,16 ± 0,57a	8,68 ± 0,18a	2,36 ± 0,07a	42,03 ± 0,31a	0,75 ± 0,006a	45,16 ± 0,31a
<b>8,15</b>	14,98 ± 0,66a	9,27 ± 0,18a	2,52 ± 0,10a	41,80 ± 0,32a	0,73 ± 0,006a	44,94 ± 0,36a
<b>10,15</b>	13,76 ± 0,50a	8,62 ± 0,17a	2,39 ± 0,07a	41,85 ± 0,24a	0,74 ± 0,005a	45,14 ± 0,36a

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Andriolo *et al.* (2010) ao avaliarem as doses 4,28; 6 e 9 mmol L<sup>-1</sup> de K na solução nutritiva do morangueiro cv. Azará não observaram efeitos sobre a firmeza dos frutos, sendo o valor médio 1,54N. Assim, no presente ensaio pode-se inferir o mesmo comportamento, ou seja, que a adubação potássica não altera a firmeza dos morangos da cv. Primoris nas condições observadas.

Os valores obtidos para o peso dos frutos estão de acordo com os encontrados por Dehghanipoodeh *et al.* (2016), 15,66 ± 6,67 g fruto<sup>-1</sup> para a mesma cultivar deste ensaio. Segundo Lin *et al.* (2004), o uso de altas doses de fertilizante potássico tem contribuído para o aumento do teor dos SST, da produtividade e do peso dos frutos. Foi possível observar o efeito benéfico das doses crescentes de K sobre o SST. Entretanto, mesmo não havendo diferenças estatísticas significativas sobre o peso em função das diferentes doses de K, a dose excessiva (10,15 mmol L<sup>-1</sup> de K) parece promover a redução deste parâmetro nos morangos.

Cardeñosa *et al.* (2015) ao estudarem o efeito do aumento da CE inicial de 1,7 dS m<sup>-1</sup>, através da adição de cloreto de sódio (NaCl) na solução nutritiva, não observaram variações nos parâmetros da cor L\*, °h e C\*, na avaliação realizada 60 dias

após a transplantação dos morangueiros cv. Primoris, cultivados em substrato orgânico em sistema hidropônico NGS®. Apesar do aumento da CE no presente ensaio ter ocorrido devido a adição de K na solução nutritiva e não de NaCl, a cor dos frutos da cv. Primoris parece não sofrer influência do aumento da CE. Segundo Miszczak *et al.* (1995), os parâmetros da cor nos morangos são mais afetados por processos fisiológicos da maturação e da conservação, do que por outros fatores.

O efeito significativo das diferentes doses de K foi observado na acidez titulável (AT) e na relação SST/AT dos frutos, em que as doses superiores a 2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K contribuíram significativamente para o aumento na AT dos frutos e a dose mais elevada de K (10,15 mmol L<sup>-1</sup>) influenciou negativamente a relação SST/AT. Sobre o pH dos frutos, não foi verificado efeito significativo das diferentes doses de K (Tabela 21).

**Tabela 21.** Acidez titulável (AT), pH e razão SST/AT total dos morangos (média ± erro padrão) em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>).

Dose K	AT (% ácido cítrico)	pH	SST/AT (°Brix/% ácido cítrico)
2,15	0,71 ± 0,09b	3,31 ± 0,05a	12,30 ± 0,78a
4,15	0,75 ± 0,09a	3,35 ± 0,03a	12,61 ± 0,43a
6,15	0,76 ± 0,08a	3,26 ± 0,04a	12,11 ± 0,64a
8,15	0,84 ± 0,07a	3,23 ± 0,03a	11,53 ± 0,43a
10,15	0,84 ± 0,07a	3,23 ± 0,04a	10,57 ± 0,46b

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Andriolo *et al.* (2010) também observaram o efeito da adubação potássica na variável AT da cv. Azará, que assim como no presente ensaio, foi mais elevada nos morangos produzidos com a dose de maior concentração de potássio. Mesmo não havendo diferenças estatísticas significativas entre a AT dos frutos produzidos acima das doses 2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K, houve uma tendência das doses 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup> de K para produzirem frutos mais ácidos.

O efeito do aumento da concentração de K sobre o aumento da AT dos morangos foi também observado por Mondal *et al.* (2017) na cv. Toyonoka. O aumento neste parâmetro parece não ser um comportamento dependente da cultivar do morangueiro e sim de uma alteração química gerada pelo excesso deste catião nos frutos. Quimicamente, o morango é considerado com boa qualidade quando apresenta acidez titulável não superior a 0,8 % (Mitcham, 2016). Segundo Ariza *et al.* (2015), a AT (% de ácido cítrico) da cv. Primoris é de cerca de 0,76 ± 0,03.

O equilíbrio entre o teor de açúcares e ácidos é comumente associado com o sabor dos morangos e medido através da relação SST/AT (Liu *et al.*, 2016). No presente ensaio houve uma tendência de redução no valor de SST/AT em função do aumento da concentração de K na solução nutritiva dos morangueiros. A dose 10,15 mmol L<sup>-1</sup> de K reduziu significativamente esta relação nos frutos.

Cultivares do morangueiro com frutos que possuem relação SST/AT de, pelo menos, 7,0 são considerados de sabor doce e ácido aceitáveis para o consumo *in natura* (Wozniak *et al.*, 1996) citado por Liu *et al.* (2016). Num ensaio realizado por Resende *et al.* (2008), em que estes autores avaliaram a relação SST/ATT de diferentes cultivares de morango e relacionando-a com a aceitação pelo consumidor, observaram que as maiores relações SST/ATT, com valores médios de 13,5 na cv. Camp-Dover foram associadas à melhor percepção do aroma do fruto e aceitação pelos consumidores.

### **3.2.2 Efeito das doses de potássio sobre o teor em K, Ca e Mg nos diferentes órgãos da planta e na parede celular dos morangos**

#### **3.2.2.1 Teor em K, Ca e Mg na planta e morangos**

A acumulação de K, Ca e Mg nos pecíolos, folhas e frutos dos morangueiros em função das diferentes doses de K estão apresentados na Figura 11.

Os valores de referência para a suficiência de nutrientes nas folhas do morangueiro no início da floração variam entre 11,0 a 25,0 mg g<sup>-1</sup> para o K; 5,0 a 15,0 mg g<sup>-1</sup> para o Ca e 2,5 a 4,5 mg g<sup>-1</sup> para o Mg (Campbell, 2000).

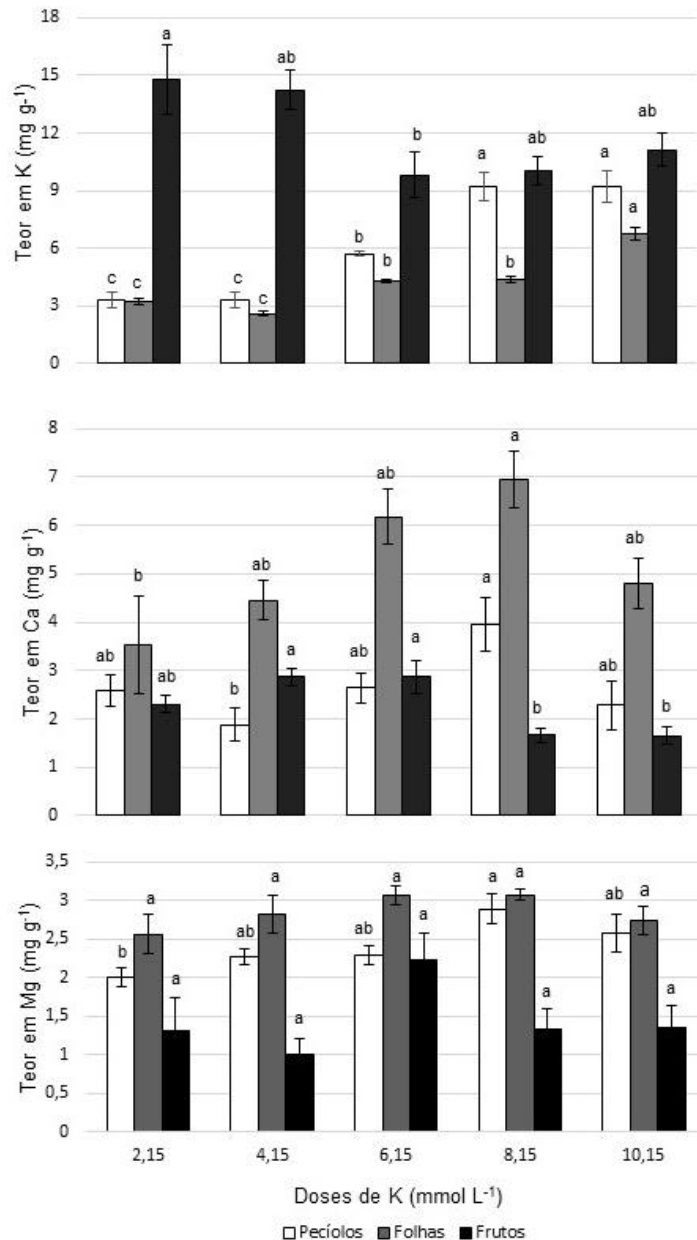
Os teores de K encontrados nas folhas do morangueiro para todas as diferentes doses de K estudadas foram inferiores aos valores de referência. Este comportamento pode ser explicado pelo facto destes teores terem sido determinados nas folhas após o final da produção dos frutos, enquanto que os valores de referência foram estabelecidos nas folhas no início da floração do morangueiro.

O teor de K nos pecíolos e folhas aumentou em função das doses crescentes de K.

A dose mais baixa (2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K) foi a que apresentou frutos com maior teor de K (14,76 mg g<sup>-1</sup>), que reduziu para cerca de 9,81 mg g<sup>-1</sup> a partir da dose controlo (6,15 mmol L<sup>-1</sup> de K). Resultados inversos ao deste ensaio foram encontrados por Mondal *et al.* (2017) para o teor de K nos morangos e por Asao *et al.* (2013) para o teor de K em melões em função do aumento das doses de K, utilizando a fonte fertilizante

KNO<sub>3</sub>. Em geral, estes autores observaram uma tendência de redução do teor de K nos frutos com a diminuição das concentrações de KNO<sub>3</sub>.

A explicação para o elevado teor de K nos frutos neste ensaio ter ocorrido nas duas doses mais baixas (2,15 e 4,15 mmol L<sup>-1</sup> de K) pode estar relacionada com a partição de nutrientes pelo morangueiro em condições de baixas concentrações de K. Observa-se que os teores de K nos pecíolos e folhas das doses mais baixas (2,15 e 4,15 mmol L<sup>-1</sup> de K) são os menores em relação às demais doses. Segundo Marschner (2012), o elevado teor de nutrientes com alta mobilidade nos frutos, como é o caso do K, deriva da captação direta das raízes e grande parte da translocação das folhas. Assim, é possível que os teores de K diminuam acentuadamente nas folhas e pecíolos durante a maturação dos frutos e sejam quase totalmente exportados para os frutos em situações de déficit deste catião na solução nutritiva.



**Figura 11.** Teor em K, Ca e Mg na massa seca dos diferentes órgãos da planta (pecíolos, folhas e frutos), em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>). Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os teores de Ca determinados nas folhas abaixo dos níveis de suficiência proposto por Campbell (2000), foram observados somente na dose 2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K. Os pecíolos e folhas com maior teor de Ca foram obtidos com a dose 8,15 mmol L<sup>-1</sup> de K. Nos frutos, o teor de Ca aumentou em função das doses crescentes até à dose controlo (6,15 mmol L<sup>-1</sup> de K), a partir da qual reduziu 42%.

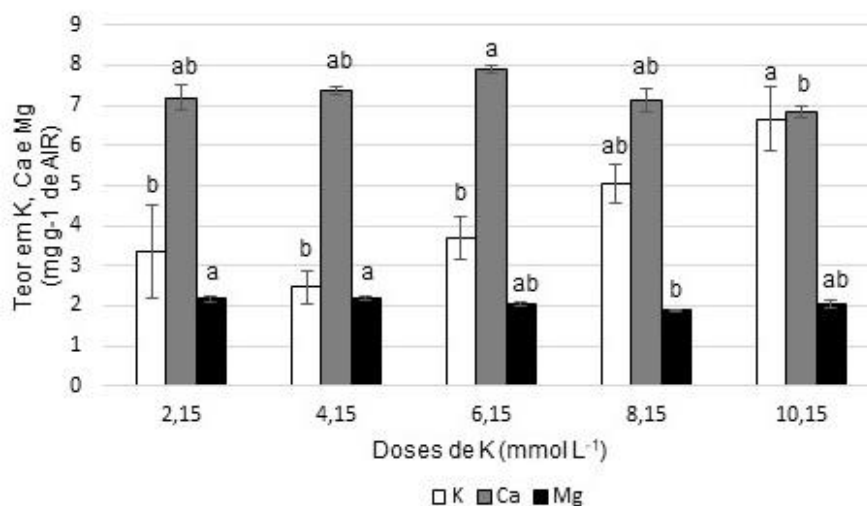
O teor de Mg nos pecíolos apresentou comportamento crescente em função das doses crescentes de K na solução nutritiva, mas não houve diferenças significativas para o teor de Mg nas folhas e frutos. Se considerarmos os valores de referência de 2,5 a 4,5 mg g<sup>-1</sup> para o Mg nas folhas (Campbell, 2000), as diferentes doses de K adicionadas na solução nutritiva não originaram uma acumulação de Mg nas folhas do morangueiros fora do intervalo aceitável.

As doses crescentes de K na solução nutritiva parecem ter beneficiado a absorção e acumulação de Ca e Mg nos pecíolos e folhas, em consequência de um aparente efeito sinérgico entre estes elementos.

Verificou-se que o manejo das doses de K na solução nutritiva pode modificar a partição dos nutrientes estudados nos tecidos vegetais, sendo este efeito mais evidente sobre o teor de K e Ca nos diferentes órgãos da planta nas condições deste ensaio.

### 3.2.2.2 Teor em K, Ca e Mg na parede celular dos morangos

Houve efeito das diferentes doses de K sobre o teor de K, Ca e Mg na parede celular (AIR) dos morangos (Figura 12). O teor de Ca, tal como ocorreu no Ensaio I deste capítulo, foi o elemento de maior expressão em mg g<sup>-1</sup> no AIR dos frutos para todas as doses de K avaliadas.



**Figura 12.** Teor em K, Ca e Mg na parede celular dos morangos (média ± erro padrão), em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>). Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

O teor de K na parede celular foi máximo (6,64 ± 0,79 g mg<sup>-1</sup>) na dose mais elevada de K (10,15 mmol L<sup>-1</sup>), em contrapartida ao teor de Ca e Mg, que foi

significativamente mais baixo nesta dose. O efeito de antagonismo na relação K:Ca:Mg pode ser observado também na parede celular dos frutos, mesmo estando o Ca em concentração mais elevada neste tecido, por ser constituinte mineral de maior predominância na parede celular (Hanson *et al.*, 1993).

A acumulação de cálcio em frutos de tomate mostrou-se dependente do fluxo de água no xilema, influenciada pela transpiração e taxa de crescimento (De Freitas *et al.*, 2014). No entanto, a acumulação de nutrientes nos frutos é determinada não só pelas taxas de importação de água, mas também pela sua prevalência relativa e mobilidade no floema e xilema. Ao contrário do  $\text{Ca}^{2+}$ , que é apenas móvel no xilema, o  $\text{K}^+$  é móvel no xilema e floema, com concentrações de  $\text{K}^+$  no floema até dez vezes às encontradas no xilema (Hocking *et al.*, 2016).

Tal como apresentado no ensaio 1 deste capítulo, o K não faz parte da estrutura da parede celular e o motivo pelo qual o excesso de K ( $10,15 \text{ mmol L}^{-1}$ ) reduziu o teor de Ca na parede celular dos frutos pode estar relacionado com a influência deste elemento no processo de transporte de água e consequente turgescência celular. A parede celular, sob pressão de turgescência superior a  $0,2 \text{ MPa}$ , enfraquece as ligações dos pectatos de cálcio na lamela média (Hepler e Winship, 2010). O excesso de K pode também promover a despolarização da membrana plasmática (Spalding *et al.*, 1999) e desta forma inibir a absorção de  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo desencadear a baixa acumulação de Ca e a deficiência deste nutriente nos tecidos vegetais. Acresce ainda o facto do K se poder ligar aos mesmos locais de ligação do Ca, tal como foi explicado no subitem 3.1.2.2 – Teor em K, Ca e Mg na parede celular dos morangos dos resultados e discussão do Ensaio I.

### 3.2.3 Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste ensaio conclui-se que as diferentes doses de K adicionadas à solução nutritiva em sistema hidropónico contendo substrato orgânico, nas condições em que este ensaio foi realizado, não influenciaram os índices relacionados com a clorofila e o estado hídrico dos morangueiros cv. Primoris.

As diferentes doses de K afetaram a condutância estomática dos morangueiros. A baixa disponibilidade de K reduziu o processo de abertura estomática e esta aumentou em função das doses crescentes de K na solução nutritiva.

Ficou claro com os resultados obtidos neste ensaio, que o aumento das doses de K acima da dose controlo ( $6,15 \text{ mmol L}^{-1}$ ), favorece o acréscimo da área específica

foliar, sendo o estabelecimento da SLA uma variável chave para interpretar o crescimento do morangueiro sob disponibilidade limitada de K.

A dose 2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K causou uma redução significativa na biomassa fresca e seca das folhas e dos pecíolos do morangueiro; em contrapartida, foi esta a dose que produziu maior biomassa fresca e número de frutos para a cv. Primoris, nas condições em que foi realizado este ensaio.

Em geral, as diferentes doses de K não afetaram os parâmetros da qualidade dos frutos, nomeadamente, o peso médio, os sólidos solúveis totais, a firmeza, a luminosidade, a saturação e a intensidade da tonalidade da cor vermelha, a acidez titulável, o pH e a relação SST/AT para a cv. Primoris, nas conduções em que foi realizado este ensaio.

O teor de K nas folhas e pecíolos e de Ca nas folhas aumentou em função das doses crescentes de K. A influência das diferentes doses de K observadas sobre o teor de Mg nos diferentes órgãos da planta foi de pouca relevância para a cv. Primoris nas condições deste ensaio em sistema hidropónico contendo substrato orgânico.

O excesso de K aumentou o teor de K na parede celular dos morangos e reduziu o teor de Ca e Mg, numa demonstração clara de que, apesar de ter não sido observado o antagonismo entre estes catiões, quando se analisa o seu teor total no fruto, este efeito pode ser observado numa análise mais precisa da parede celular dos frutos. Assim, o manejo do K na solução nutritiva modifica a partição, principalmente do K e Ca nos diferentes órgãos do morangueiro e parede celular.

De forma geral, os resultados obtidos no ensaio I e II confirmam que as diferentes doses de K não apresentam grande efeito sobre os parâmetros fotossintéticos da planta e não afetam de forma negativa o estado hídrico dos morangueiros, independentemente da utilização da cultivar do morangueiro San Andreas ou Primoris e do sistema hidropónico contendo areia ou substrato orgânico.

O facto da dose controlo (5,7 mmol L<sup>-1</sup> de K) ter sido a mais produtiva no ensaio I e a dose mais baixa de K (2,15 mmol L<sup>-1</sup>) a mais produtiva no ensaio II, podem ser atribuídos à utilização do substrato inerte (areia) e do substrato orgânico (perlite e fibra de coco) com capacidade de troca catiónica.

Assim, ficou claro com os resultados destes dois ensaios, que o manejo da concentração de K na solução nutritiva em função do meio de crescimento das plantas, areia ou substrato orgânico, é de extrema importância para a maximização da produção de frutos, economia de fertilizante e, conseqüentemente, para um sistema produtivo mais sustentável.



## Capítulo III

---



## Influência do potássio na expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no transporte intracelular do cálcio em morangos

---

### 1. Introdução

A maioria dos nutrientes absorvidos pelas plantas estão na forma iônica e requerem uma grande variedade de proteínas transportadoras que asseguram o seu movimento através das membranas celulares e o seu armazenamento nos diferentes compartimentos celulares como as paredes celulares, o citosol e os vacúolos (Epstein e Bloom, 2006).

As plantas dependem de um suplemento suficiente de minerais para o crescimento e desenvolvimento adequado e o excesso ou a deficiência de um mineral pode levar não apenas ao aparecimento de sintomas de toxicidade ou deficiência do mineral em questão, mas também desencadear processos fisiológicos que envolvam a acumulação ou deficiência de outros minerais, como por exemplo ocorre no caso da interação  $K^+ : Ca^{2+}$ .

O Ca é um mineral de extrema importância para o crescimento ideal das plantas e qualidade dos frutos. No entanto, a absorção desse elemento é fortemente dependente da presença de outros cátions, como por exemplo o  $K^+$  (Tuteja e Mahajan, 2007; Wang e Wu, 2013). A nível molecular, a presença de níveis elevados de  $K^+$  pode reduzir a absorção de  $Ca^{2+}$ , por outro lado, a deficiência de  $K^+$  pode desencadear uma série de reações bioquímicas que incluem a síntese de moléculas relacionadas com a sinalização, fluxo e acumulação do  $Ca^{2+}$  no citosol (White e Broadley, 2003; Mcainsh e Pittman, 2009; Laohavisit *et al.*, 2012; Wang e Wu, 2013).

O Ca é um dos mais importantes constituintes minerais da parede celular (Epstein e Bloom, 2006) ligando-se a fosfolípidos e proteínas na superfície da membrana, sendo por isso necessário para manter a estrutura e integridade da parede celular (White e Broadley, 2003). Além de funcionar como componente estrutural, o  $Ca^{2+}$  atua como molécula sinalizadora na percepção de condições de *stress* biótico e abiótico a que a planta está sujeita, provocando mudanças nos níveis de  $Ca^{2+}$  celulares e, conseqüentemente, desencadeando as respostas biológicas da planta (Tuteja e Mahajan, 2007).

Para manter os níveis de  $Ca^{2+}$  adequados é necessário que o transporte deste cátion esteja ativo no citosol. Para tal, o bom funcionamento das proteínas transportadoras de  $Ca^{2+}$  é imprescindível, de modo a que após a sinalização sejam restabelecidos os níveis baixos de  $Ca^{2+}$  no citosol. A remoção de  $Ca^{2+}$  do citosol para o

apoplasto ou para organelos intracelulares contra o seu gradiente eletroquímico requer um transporte ativo que necessita de energia, sendo as bombas Ca-ATPases as principais proteínas que catalisam esse movimento e promovem a partição e distribuição de Ca<sup>2+</sup> nos diferentes órgãos da planta (Hirschi, 2001).

As proteínas V-ATPase e PPase são também bombas de Ca<sup>2+</sup>, que criam um potencial eletroquímico em toda a membrana dos organelos de armazenamento, sendo também usadas por outras proteínas como os CAXs, para impulsionar a absorção de Ca<sup>2+</sup> (White e Broadley, 2003). Consequentemente, as V-ATPases e as PPases também podem desempenhar um papel importante na condução da acumulação de Ca<sup>2+</sup> nas células.

Em adição às bombas de Ca<sup>2+</sup> que asseguram o transporte de Ca<sup>2+</sup> associado ao consumo de energia, estão as proteínas CAXs que medeiam a partição e distribuição do Ca<sup>2+</sup> do citosol para o vacúolo nos diferentes órgãos vegetais, estando envolvidos em várias vias de resposta ao *stress* biótico e abiótico em plantas (Pittman e Hirschi, 2016).

A função de todas estas proteínas encontra-se bem documentada em *A. thaliana*. Em morangueiro, tendo em conta a pesquisa efetuada, não foi possível encontrar nenhum trabalho que aborde esta temática. Considerando a importância que o K tem na qualidade dos frutos, associado à inexistência de sintomas de toxicidade, quer ao nível de parte vegetativa, quer nos frutos até a data da colheita, é de elevado interesse perceber se uma sobredosagem, comum nesta cultura, está associada à alterações fisiológicas que possam implicar uma diminuição da qualidade do fruto.

Suspeita-se que um excesso de K<sup>+</sup> fornecido à planta possa estar associado a um desequilíbrio nos processos fisiológicos que, consequentemente, desencadeiam a nível molecular, a ativação de genes codificadores da síntese de proteínas envolvidas no transporte ativo de Ca<sup>2+</sup> através da membrana plasmática e organelos de armazenamento (parede celular, citosol e vacúolo). Porém, até ao momento não se conhece nenhum estudo em morangueiro que pretenda compreender o envolvimento dos transportadores de Ca<sup>2+</sup> na manutenção da homeostase celular associada a um excesso de K. Assim, o objetivo deste ensaio foi verificar se diferentes concentrações de K fornecidas ao morangueiro estão associadas a movimentos de Ca<sup>2+</sup> na célula com o objetivo de readquirir a homeostase iónica no meio intracelular. Para tal, avaliou-se a variação do nível de transcritos de genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de Ca<sup>2+</sup> nas células de frutos de morango.

Tendo em conta trabalhos prévios efetuados noutras espécies (De Freitas *et al.*, 2010; De Freitas *et al.*, 2013), foram considerados 10 genes de interesse: *V-ATPase* e

*PPase*, que fazem parte de complexos proteicos que constituem bombas de transporte que geram um gradiente eletroquímico através da membrana no tonoplasto e afetam indiretamente o movimento de  $\text{Ca}^{2+}$  no compartimento vacuolar; três genes pertencentes à família das CAXs (*CAX3*, *CAX5* e *CAX6*); cinco genes da família das Ca-ATPases (*Ca-ATPase1*, *Ca-ATPase2*, *Ca-ATPase3*, *Ca-ATPase4* e *Ca-ATPase11*).

Para tentar estabelecer uma relação entre o nível de transcrito (expressão génica) e o nível celular de  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  foi determinada a concentração total de ambos os iões nas mesmas amostras que foram utilizadas no estudo molecular.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Material vegetal, instalação e condução do ensaio**

Foram utilizadas plantas de morangueiro *F. x ananassa* cv. San Andreas adquiridas de viveiro certificado, frigoconservadas, de raiz nua, propagadas a partir de estolhos, livres de doenças, com 5 a 7 cm de comprimento da parte aérea.

As plantas foram transplantadas para vasos de 3 L contendo uma camada de aproximadamente 3 cm de pedra do tipo 'brita' no fundo, coberta por um círculo de rede de sombreamento e o restante volume do vaso foi preenchido com areia lavada. Para promover a drenagem eficiente da água e da solução nutritiva excedente, os vasos possuíam três furos no fundo e pratos com tamanhos apropriados. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento artificial regulada à temperatura de 25 °C, 85 % de humidade relativa, 500  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa e 16 horas de fotoperíodo. A instalação do ensaio foi feita no laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal da Universidade de Évora, no Pólo da Mitra em Valverde, Évora, Portugal.

A rega foi feita manualmente durante todo o ensaio. A periodicidade e o volume da rega após a transplantação dos morangueiros encontram-se descrita na Tabela 22.

**Tabela 22.** Periodicidade e volume da rega após a transplantação dos morangueiros.

Período após a transplantação	Periodicidade da rega	Volume
1 - 3 dias	2 vezes ao dia	
	9:00 e 17:30 horas	100 ml de água destilada.
4 - 10 dias	4 vezes ao dia	100 ml de cada tratamento com
	9:00, 12:00, 15:00 e 17:30 horas	a concentração reduzida a 50 %.
> 10 dias	4 vezes ao dia	
	9:00, 12:00, 15:00 e 17:30 horas	400 ml de solução intercalada com 200 ml de água destilada.

Durante todo o ensaio foram realizadas manutenções das plantas, como a remoção das folhas secas. Na fase da floração, a polinização foi realizada manualmente com o auxílio de um pincel macio.

O ensaio, que se realizou entre 18 de março e 3 de agosto de 2015, foi constituído por dois fatores de variação: três doses de K (2,15; 6,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>) e três períodos de colheita dos frutos.

Cada período de colheita correspondeu a um intervalo de 14 dias, sendo que o primeiro período ocorreu aos 60 dias após a transplantação (16 junho a 01 julho), o segundo entre 02 e 15 julho e o terceiro entre 16 julho e 03 de agosto.

O ensaio foi realizado com cinco plantas por tratamento. Para as análises realizadas foram utilizados dois morangos por planta de três das cinco plantas, totalizando seis morangos (repetições biológicas) por tratamento e por período de colheita.

Os morangos foram colhidos todos no mesmo estágio de maturação, quando no mínimo  $\frac{3}{4}$  da epiderme apresentava coloração vermelha (aproximadamente 30 dias após a antese).

No ato da colheita, foram descartados o pedicelo e as sépalas dos morangos e estes foram imediatamente acondicionados em sacos plástico previamente identificados, congelados em azoto líquido e armazenados em câmara ultra congeladora (-80 °C) para posterior extração de RNA total.

## 2.2 Preparação da solução nutritiva

A solução nutritiva de cada tratamento referente às diferentes doses de K foi definida a partir da recomendação da solução nutritiva para a cultura do morangueiro

proposta por Hennion e Veschambre (1997) incluindo algumas modificações. As concentrações de macro e micronutrientes utilizadas como controlo encontram-se na Tabela 3.

A quantidade ( $\text{g L}^{-1}$ ) utilizada de macronutriente em cada tratamento encontra-se descrita na Tabela 23 e os micronutrientes foram fornecidos através da diluição de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,15 \text{ g L}^{-1}$  para cada tratamento das fontes comerciais Yara<sup>®</sup> Nutrel C e Keliron<sup>®</sup>, respetivamente.

**Tabela 23.** Quantidade ( $\text{g L}^{-1}$ ) das fontes minerais contendo macronutrientes adicionadas à água na formulação da solução nutritiva de acordo com cada tratamento contendo as doses crescentes de potássio.

Fonte Mineral	Tratamento ( $\text{mmol L}^{-1} \text{ K}$ )		
	2,15	6,15	10,15
	$\text{g L}^{-1}$		
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0,1	0,1	0,1
$\text{MgSO}_4$	0,3	0,3	0,3
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,43	0,5	0,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,25	0,373	0,373
$\text{KNO}_3$	0	0,3	1,5
$\text{KCl}$	0	0	1,55
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,08	0	0
$\text{NaNO}_3$	0,32	0	0

As soluções nutritivas foram preparadas semanalmente com água destilada e a CE e pH foram monitorizados com o auxílio de eletrocondutímetro (Hanna instrument<sup>®</sup>, Rhode Island, USA) e do medidor de pH (Hanna instrument<sup>®</sup>, Rhode Island, USA), respetivamente.

O pH foi ajustado a  $5,75 \pm 0,25$  com a adição de uma solução de correção de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$ ) ou ácido fosfórico ( $\text{H}_2\text{PO}_4$  a 10 %) quando necessário. A CE para cada tratamento em ordem crescente foi em média: 1,55; 1,73 e  $2,07 \text{ dS m}^{-1}$ .

### 2.3 Isolamento do RNA total e síntese do DNA complementar

Cada um dos seis morangos considerados como réplicas biológicas independentes foram macerados individualmente com azoto líquido em almofariz previamente tratado com  $\text{NaOH}$  e esterilizado. Deste macerado, foram utilizadas aproximadamente 100 mg para a extração do RNA total utilizando o *kit* de purificação

comercial Maxwell 16 LEV simplyRNA (Promega) e o equipamento Maxwell 16 (Promega), seguindo os procedimentos de acordo com as instruções do fabricante, incluindo o uso de DNase para garantir a eliminação de DNA genômico contaminante.

As amostras foram eluídas em 50 µl de tampão de eluição, conforme as instruções indicadas no protocolo do *kit* utilizado para a extração do RNA total. A quantificação do RNA total e a avaliação da sua pureza foram determinadas com base nas razões de absorvância a 260/280 e 230/260 obtidas no espectrofotômetro NanoDrop-2000C (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

A integridade do RNA total extraído foi avaliada através de uma eletroforese em gel de agarose (1,2 % em tampão TAE 1x.). A presença das duas subunidades ribossômicas foi avaliada após a coloração do gel numa solução de EtBr (2 ngm L<sup>-1</sup>) durante 20 minutos seguido de uma lavagem do gel em água destilada durante 20 minutos. O resultado da eletroforese foi visualizado no sistema *Gene Flash Bio Imaging* (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

Para a síntese do cDNA utilizou-se 0,8 µg de RNA total e o *kit* cDNA Maxima First Strepara RTqPCR (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

#### **2.4 Determinação do nível de transcrição por PCR em tempo real**

A determinação do nível de transcrito foi efetuada por PCR em tempo real com auxílio do aparelho *Applied Biosystems* 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a mistura de reação, foi utilizado 1x Máxima SYBR Green qPCR Master Mix, 300 nM de cada *primer* e 3 µl de cDNA (previamente diluído 1:10) num volume total de reação de 18 µl.

Dos genes codificadores de proteínas envolvidas no transporte de Ca<sup>2+</sup> na célula vegetal, foram considerados 10 genes de interesse (Tabela 24). Para seleção dos genes de referência a utilizar na normalização dos resultados dos genes de interesse foram considerados 4 genes previamente descritos como genes de referência em trabalhos semelhantes (Chen *et al.*, 2011a; Velada *et al.*, 2016): Actina, Gliceraldeído 3-fosfatase desidrogenase (GAPDH), 18S ribossomal (18sRNA) e Oxidase alternativa 2 (AOX2).

Os genes foram identificados em *F. vesca* ou *F. x ananassa* por homologia com as sequências anotadas de *A. thaliana* depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Plaza 3.0 ([https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza\\_v3\\_dicots/](https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v3_dicots/)). Para confirmar



que o gene identificado correspondia de facto ao gene de interesse, a sequência obtida por homologia foi utilizada para uma análise por Blastn no NCBI.

Os *primers* foram desenhados com auxílio do *software* Primer Express v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando as sequências previamente identificadas. Todos os pares de *primers* foram avaliados quanto à sua probabilidade para formar dímeros e estruturas secundárias. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descrita na Tabela 24.

**Tabela 24.** Sequência dos *primers* utilizados neste estudo e outros parâmetros considerados relevantes.

Gene (acesso no Phytozome e NCBI)	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	Ampl. (bp)	Tm (°C)	R <sup>2</sup> / E (%)
<i>V-ATPase1</i> (FV0G18110)	Fw: GGCCTGTCGCATCAAAGC Rv: CAGAACACGCTGCCAGTAA	59	83	0,998/99,32
<i>PPase</i> (FV6G01830)	Fw: CATACTGGTTTTTCAGCCATGACA Rv: GCGAACCTCTTCGACCATTTT	71	78	0,999/101,42
<i>CAX3</i> (FV6G10520)	Fw: TTGTGTGGTTGGTTGGAATGA Rv: CAATCGTTCCGACGACATACTC	66	78	0,995/101,46
<i>CAX5</i> (FV3G34880)	Fw: TTTGGCTGAGCGTTTAGGTTATG Rv: ACCCCCAACAGTAGGTCCAGTA	64	80	0,999/98,44
<i>CAX6</i> (FV6G35820)	Fw: CTGCAACCGGAGCAACTTG Rv: CCCAGACTGCTTCTGCTGTTC	60	83	0,998/100,85
<i>CaATPase1</i> (XM_004302762)	Fw: TTCCTGCCGATATGCGTGTA Rv: GCCCTGCTCAACCCTCAA	59	80	0,999/104,79
<i>CaATPase2</i> (XM_004288199)	Fw: GCCCTGCAGGACATGACTCT Rv: TCCAACGAGAAGCGACACAA	63	80	0,999/100,69
<i>CaATPase3</i> (XM_004290935)	Fw: CATTGCAACGGATGGCATT Rv: CTCAACCAGCATCCTTTTATGAGA	62	79	1,00/103,89
<i>CaATPase4</i> (XM_004295908)	Fw: TCCGGTGTGGTCGAAAGAC Rv: CTCGCGGCTCACCTTGAAT	58	83	0,998/102,46
<i>CaATPase11</i> (XM_004303594)	Fw: AAATGGAGAGCTACCTGCACAAG Rv: TCCGCCGAGAGGTGCTT	58	84	0,991/100,38
<i>Actina</i> (XM_004306544)	Fw: CCCGACGGCCAAGTCA Rv: AGGACTTCTGGGCACCTGAA	56	83	0,997/104,40
<i>GAPDH</i> (AB363963)	Fw: CCAAGGCTGTCGAAAGGT Rv: GCCATTCCGGTCAATTTGC	55	82	0,998/99,09
<i>18sRNA</i> (XM_011464048)	Fw: CGGCCGAGCTCCAA Rv: CGAGCTTCTCGTCATTGTAGA	53	84	0,998/103,76
<i>AOX2</i> (XM_004299702)	Fw: GCTCCGACGCGAAGAAAG Rv: TTCGGCCTCGCAATTCC	58	81	0,999/97,78

Ampl. = tamanho do amplicão,  $T_m$  = temperatura de Melt,  $R^2/E$  = coeficiente de determinação e eficiência dos *primers*. As sequências correspondentes aos genes *V-ATPase1*, *PPase*, e *CAXs* foram retiradas do PLAZA 3.0 ([https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza\\_v3\\_dicots/](https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v3_dicots/)). As sequências correspondentes aos restantes genes indicados na tabela foram obtidas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A amplificação teve início com 10 minutos a 95 °C e decorreu posteriormente durante 40 ciclos com o programa de 15 segundos a 95 °C e 60 segundos a 60 °C.

Para garantir a especificidade dos *primers*, foi analisada a curva de melting gerada para cada reação (Anexo – Figura 1 a 14). A possibilidade de ocorrência de contaminações e a formação de dímeros foram descartadas utilizando controlos negativos (NTCs). Todas as amostras foram feitas em duplicado.

Para a determinação da eficiência de amplificação (E), foi feita uma curva padrão para cada par de *primers* com quatro pontos, utilizando como *template* do primeiro ponto uma mistura não diluída contendo todas as amostras de cDNA do ensaio. Os três pontos seguintes corresponderam às diluições de 1/4, 1/16 e 1/32 da amostra utilizada como *template* no primeiro ponto. O cálculo do valor de E foi efetuado utilizando a fórmula  $E = 10^{(-1 / \text{inclinação da reta})}$ , onde o valor da inclinação da reta foi obtido através do software Applied Biosystems (AB). Os valores correspondentes ao ciclo de quantificação (Cq) para cada amostra, ou seja, ao momento em que é detetada a amplificação exponencial, foram obtidos com o software Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e utilizados posteriormente para o cálculo da expressão relativa.

## 2.5 Determinação da expressão e estabilidade do gene de referência

O algoritmo GeNorm foi utilizado para determinar a estabilidade da expressão de cada um dos 4 genes candidatos a genes de referência (GR). Os dados utilizados para o cálculo do algoritmo foram os valores das quantidades relativas (QR) calculadas utilizando o valor Cq de cada amostra e seguindo o método delta-Ct ( $\Delta C_t$ ) utilizando a fórmula  $GR = E^{\Delta C_q}$ , onde E corresponde à eficiência de amplificação de cada par de *primers* e  $\Delta C_q = \text{menor valor de Cq detetado no ensaio} - C_q \text{ da amostra}$  (Vandesompele *et al.*, 2002).

O algoritmo GeNorm avalia a variação dos dados e determina o melhor número de genes de referência necessários para mais corretamente efetuar a normalização dos resultados da expressão dos genes de interesse tendo como valor limite o 0,15 (Vandesompele *et al.*, 2002).

## **2.6 Análise da expressão génica**

Para a normalização dos níveis de expressão dos genes de interesse, os valores de C<sub>q</sub> foram convertidos em QR pelo método  $\Delta C_t$ , como descrito na secção anterior (2.5 Determinação da expressão e estabilidade do gene de referência). O fator de normalização foi determinado pelo algoritmo GeNorm e corresponde à média geométrica das quantidades relativas dos GRs para cada amostra.

Para cada gene de interesse o valor da expressão génica foi obtido fazendo a relação entre as quantidades relativas e o fator de normalização obtido para cada amostra.

## **2.7 Determinação do teor K e Ca total nos morangos utilizados no estudo de expressão génica**

Uma amostra de 0,5 g de cada morango utilizado no estudo de expressão génica foi utilizada para determinar o teor de K e Ca. A metodologia utilizada para esta determinação encontra-se descrita no Material e Métodos do Ensaio I - 2.6.3 *Avaliação do teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta (Teor em Ca, K e Mg total nos morangos)*.

## **2.8 Análise estatística dos dados**

Os dados obtidos na expressão génica e na quantificação do K e Ca, foram submetidos à análise de variância (Anova) e comparação de médias pelo teste de Tukey e foram considerados níveis de significância  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,1$  utilizado o programa estatístico SPSS® for Windows, Statistic version 24 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.).

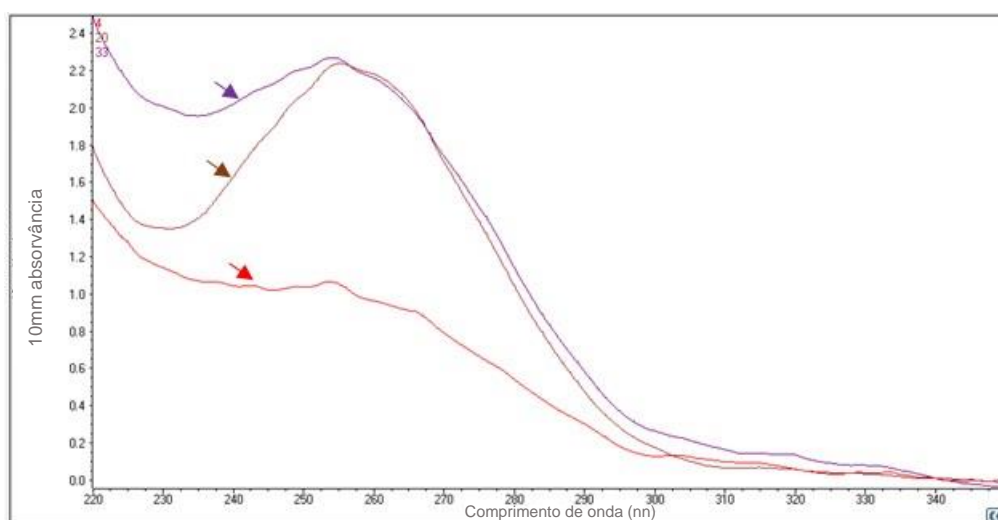
## **3. Resultados e discussão**

### **3.1 Avaliação da qualidade e integridade do RNA total**

Os valores das absorvâncias obtidos aquando das medições efetuadas no espectrofotómetro revelaram um bom nível de pureza das soluções de RNA total o que permitiu utilizar este RNA para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizado nos estudos de expressão génica.

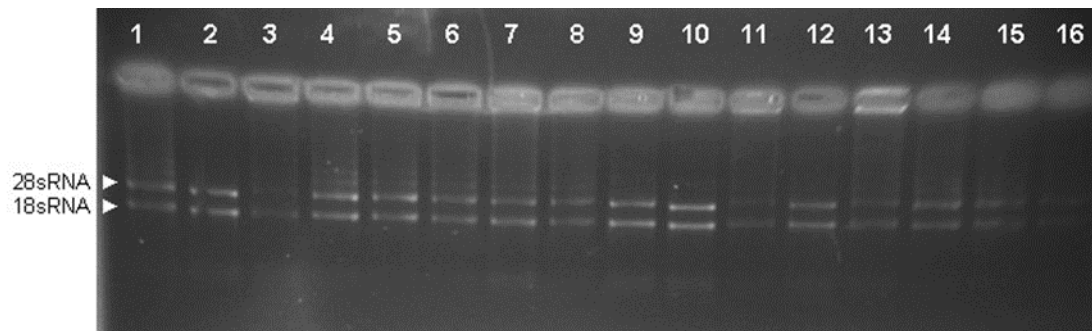
Na figura 13 apresenta-se o exemplo da curva obtida aquando da leitura das absorvâncias de três amostras de RNA total. A amostra de RNA de boa qualidade apresenta uma curva sinusoidal.

A razão das absorvâncias 260/280 nm, utilizada para avaliar a contaminação por proteínas (com um pico de absorvância a 280 nm), apresentou valores de 2.0 ou muito próximos deste, revelando assim que as amostras se encontravam livres de proteínas. O segundo parâmetro utilizado para avaliar a pureza das soluções de ácidos nucleicos – razão das absorvâncias 260/230 nm - permitiu verificar que as amostras se encontravam livres de contaminantes com um pico de absorvância em torno dos 230 nm, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol.



**Figura 13.** Imagem representativa da leitura das absorvâncias (efetuada a 230, 260 e 280 nm) efetuada em três amostras de RNA total extraído de morango. A curva indicada com a seta a negro corresponde à forma correta que deve apresentar uma amostra de RNA de boa qualidade. A vermelho a curva correspondente a uma amostra com contaminantes detetados a 280 nm e a roxo com contaminantes detetados a 230 nm.

Da mesma forma, a análise efetuada em gel de agarose revelou uma boa integridade para cada uma das amostras extraídas (Figura 14), sendo possível distinguir as bandas correspondentes às duas subunidades ribossomais (28sRNA e 18sRNA). A inexistência de DNA genómico contaminante foi também confirmada em gel de agarose uma vez que não foi identificada nenhuma banda que pudesse corresponder a esse peso molecular.



**Figura 14.** Imagem representativa do resultado obtido na avaliação da integridade do RNA total extraído de morangos. No gel é possível observar duas bandas de diferentes pesos moleculares, características do RNA ribossomal 28sRNA e 18sRNA, respectivamente, e a inexistência de bandas de DNA genômico contaminante.

### 3.2 Avaliação da especificidade de amplificação e eficiência dos *primers*

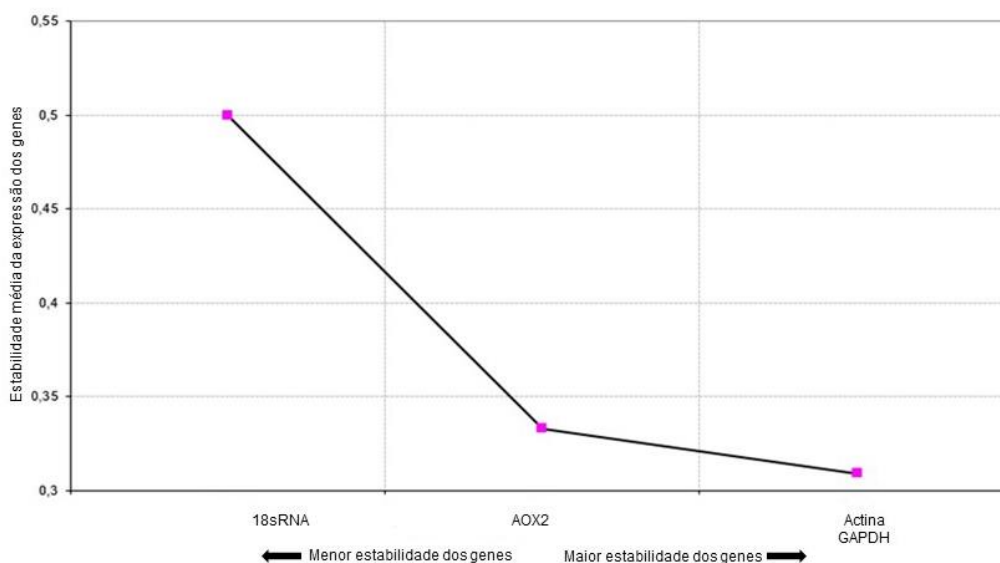
A especificidade de amplificação de cada conjunto de *primers*, correspondentes a um gene específico, foi confirmada através da análise da curva de melting. A existência de um pico único para todas as amostras, o que significa uma temperatura de melting comum a todos os amplicões, e a sua correspondência à temperatura esperada permitiu concluir acerca da especificidade dos *primers* (Anexo 3, Figuras de 1 a 14).

Os valores correspondentes ao declive da reta padrão e ao coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foram obtidos no *software* AB. Os valores de  $R^2$  variaram entre 0,991 para a *Ca-ATPase11* e 1,00 para a *Ca-ATPase3* e os valores do declive variaram entre -3,376 (E= 97,78 %) para o gene *AOX2* e -3,212 (E= 104,787 %) para o gene *CaATPase1* (Anexo 3 – Tabelas 6 e 14). A eficiência dos *primers* variou entre 97,78 % (*AOX2*) e 104,79 (*Ca-ATPase1*), encontrando-se no intervalo dos 90 - 110 %, comumente referido como o intervalo de variação aceitável. Os gráficos obtidos para a reta padrão de cada gene contendo a inclinação da reta (slope),  $R^2$  e a E encontram-se em Anexo (Anexo 3 – Figuras 1 a 14).

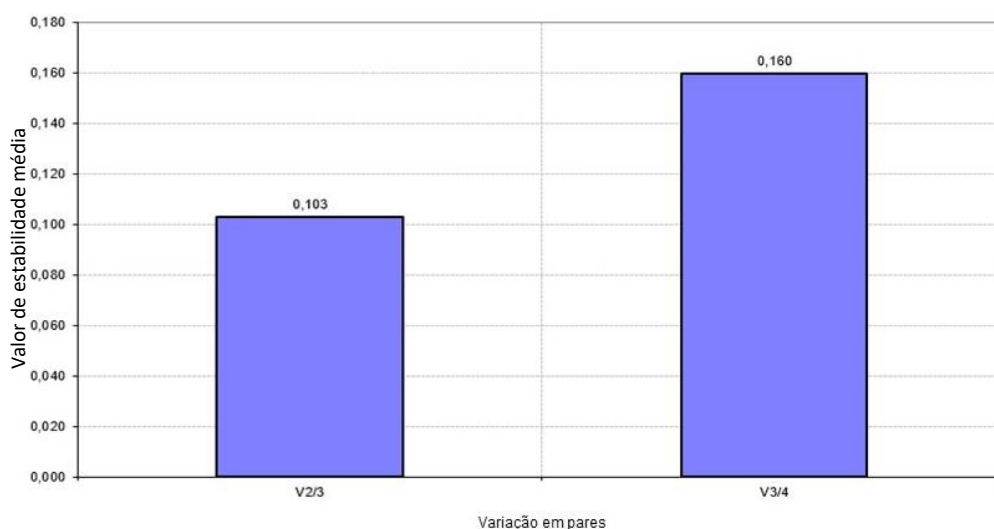
### 3.3 Seleção dos genes de referência

A análise da expressão dos quatro genes selecionados como candidatos a genes de referência, utilizando o algoritmo GeNorm, mostrou que os genes mais estáveis, nas condições do estudo, foram os genes da *Actina* e do *GAPDH*, seguido do gene *AOX2* e do *18SRNA*, sendo o último o que mostrou maior variabilidade nos valores de expressão (Figura 15). Segundo os resultados obtidos, a combinação do gene de *Actina* e *GAPDH* apresentou um valor M inferior a 0,15 (Figura 16), devendo o fator de normalização

gerado pela média geométrica destes dois genes ser utilizado para proceder à normalização dos resultados de expressão dos genes de interesse (*V-ATPase*, *PPase*, *CAXs* e *Ca-ATPases*).



**Figura 15.** Valores médios da estabilidade de expressão dos genes de referência *18sRNA*, *AOX2*, *actina* e *GAPDH*.

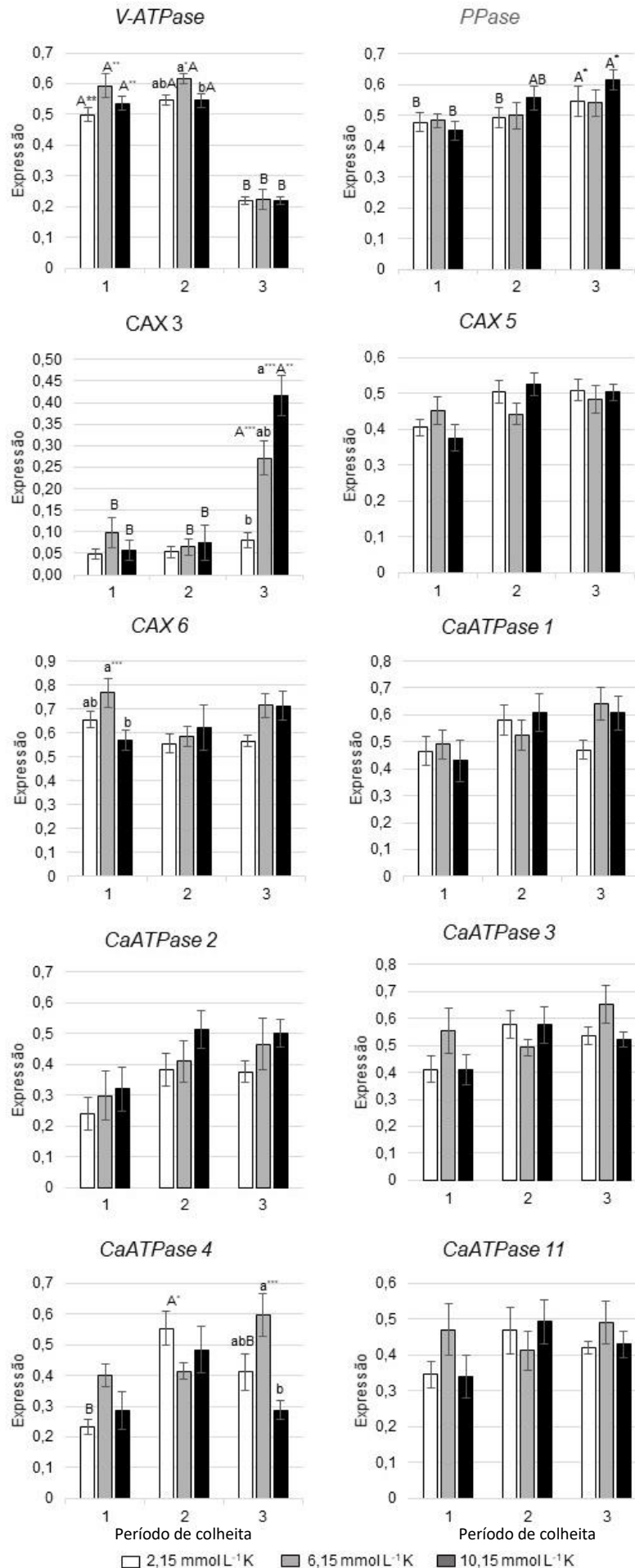


**Figura 16.** Determinação do número ótimo de genes de referência para a normalização da análise da expressão considerando como valor limite  $M < 0,15$  (Vandesompele *et al.*, 2002).

### 3.4 Análise da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de cálcio no fruto em resposta a diferentes doses de potássio aplicadas em morangueiro

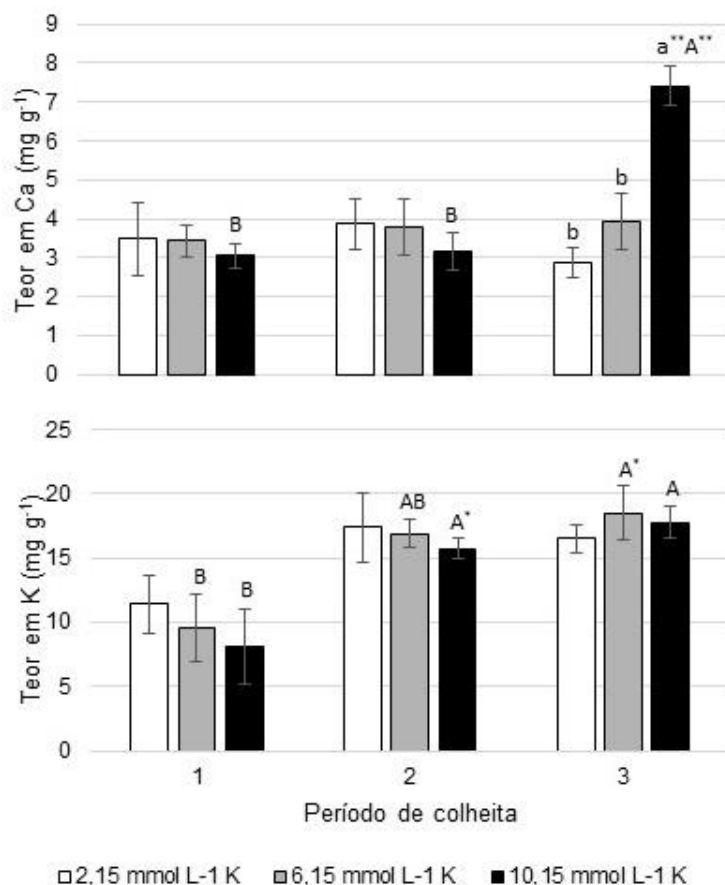
O transporte iônico através da membrana que delimita o tonoplasto é assegurado por duas bombas de prótons que requerem energia para o seu funcionamento, a H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar (V-ATPase) e a H<sup>+</sup>-pirofosfatase vacuolar (PPase) (Krebs *et al.*, 2010). No contexto da produção vegetal, a capacidade de tamponizar alterações nas concentrações de íons essenciais ou tóxicos está diretamente relacionada com a estabilidade na produção. Apesar da inexistência de sintomas de toxicidade em morangos associados a um excesso na adubação com K, foi objetivo do presente trabalho perceber até que ponto um *stress* provocado por déficit ou excesso deste íon, estaria associado à qualidade do fruto e, a nível molecular, perceber se os mecanismos associados ao movimento e redistribuição do cálcio na célula estão implicados na reacquirição da homeostasia iónica e, conseqüentemente, na qualidade do fruto. Perante as condições do estudo verificou-se que a alteração na expressão dos genes *V-ATPase* esteve associada às diferentes concentrações de K<sup>+</sup> adicionadas à solução nutritiva das plantas (Figura 17).

O padrão de expressão observado no gene *V-ATPase*, no primeiro e segundo período de colheita, sugere uma sub-expressão do gene associada às duas condições de *stress*, apesar da existência de diferenças significativas se verificar apenas no período 2. No terceiro período de colheita o padrão de expressão do gene nas três concentrações de K foi muito semelhante. No entanto, é neste período de colheita, quando comparado com o período 1 e 2, que ocorre uma diminuição significativa do nível de transcrito de aproximadamente 3x, independentemente do suplemento de K. Neste caso, sendo a variação comum às três doses de K estudadas, o fator responsável por esta variação na expressão será obviamente comum. Assim, podemos propor o envolvimento da *V-ATPase* no desenvolvimento da planta sendo esse refletido no fruto. O envolvimento deste gene no desenvolvimento foi recentemente discutido em *A. thaliana* (Zhou *et al.*, 2016). No trabalho destes autores verificou-se que uma sobre-expressão do gene *V-ATPase* conduziu a um melhor crescimento da planta (comprimento das raízes, peso fresco, altura da planta e número de frutos) quer sob condições normais quer sob *stress*; e, pelo contrário, a redução da atividade da enzima conduziu a um crescimento retardado. Focando o envolvimento deste gene no desenvolvimento do fruto, num estudo realizado com peras, o gene *V-ATPase* e também o gene da *PPase* (discutido abaixo) apresentaram variações na sua expressão ao longo dos diversos estádios de desenvolvimento (Shiratake *et al.*, 1997).





**Figura 17.** Nível de expressão dos genes *V-ATPase*, *PPase*, *CAX3*, *CAX5*, *CAX6*, *CaATPase1*, *CaATPase2*, *CaATPase3*, *CaATPase4* e *CaATPase11* (média  $\pm$  erro padrão) em função das doses de K (2,15; 6,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>) e períodos de colheita (1, 2 e 3). Letras minúsculas representam as diferenças na expressão do gene nas diferentes doses de K no mesmo período de colheita dos frutos e letras maiúsculas representam as diferenças na expressão do gene entre períodos de colheita dos frutos. Médias e erros padrão seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si a 1%, 5% e a 10% de probabilidade pelo teste de Tukey. \*\*, \* e \*\*\* F significativo a 1%, 5% e 10% de probabilidade, respectivamente.



**Figura 18.** Teor em Ca e K total nos morangos em função das doses de K (2,15; 6,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>) e períodos de colheita (1, 2 e 3). Letras maiúsculas representam as diferenças no teor de K nos morangos entre períodos. Médias e erros padrão seguidas por letras diferentes diferiram entre si a 5% de probabilidade e médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. \*- F significativo a 5% de probabilidade; médias com ausência de letras – F não significativo.

No presente estudo, ainda que os frutos tenham sido colhidos nos três períodos de colheita no mesmo estado de maturação (mínimo  $\frac{3}{4}$  da epiderme vermelha), e que ao nível do fruto não tenham sido detetadas visualmente diferenças que correspondessem ao envelhecimento das plantas, para melhor elucidar a questão

relativa ao envolvimento da *V-ATPase* no desenvolvimento vs resposta ao déficit/excesso de K seria de interesse estudar a expressão deste gene ao longo do desenvolvimento da parte vegetativa e do fruto. Por outro lado, sendo a expressão deste gene altamente dependente do tecido estudado (De Freitas *et al.*, 2010), ao nível do fruto seria interessante considerar também o estudo em diferentes tecidos (epiderme e polpa por exemplo).

Relativamente à *PPase* não foram identificadas diferenças significativas entre os três tratamentos considerando isoladamente cada período de colheita. No entanto, a comparação entre os três períodos de colheita revela um aumento significativo da expressão associado a um excesso de K. Coincidentemente, o valor mais elevado de Ca foi detetado no terceiro período de colheita (cerca de 1,5x), podendo este valor estar relacionado com a necessidade da planta mobilizar mais iões e como tal requerer mais proteína (Figura 18). Diversos trabalhos referem que a absorção de  $\text{Ca}^{2+}$  é fortemente dependente da presença de outros catiões, nomeadamente o  $\text{K}^+$  (White e Broadley, 2003; Tuteja e Mahajan, 2007; Mcainsh e Pittman, 2009; Laohavisit *et al.*, 2012; Wang e Wu, 2013). Adicionalmente, De Freitas *et al.* (2012) mostraram também que o período de exposição ao *stress* está associado a diferença na expressão dos genes, o que suporta as diferenças encontradas no presente trabalho ao longo dos três períodos de colheita.

Considerando ainda os dois genes associados às bombas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (*V-ATPase* e *PPase*), trabalhos prévios realizados em maçã revelaram que em frutos manifestando sintomas de uma desordem fisiológica (*bitter pit*) apenas a expressão do gene da *PPase* foi alterada, apresentando um aumento da expressão (De Freitas *et al.*, 2010). Os mesmos autores revelaram ainda que a expressão deste gene, bem como da *PPase* depende do tecido estudado. Perante estes resultados é possível reforçar a ideia da necessidade de estudos posteriores considerando a análise da expressão não apenas no fruto, mas também na parte vegetativa, e no caso do fruto, considerar diferentes tecidos.

A atividade combinada das duas bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  (*V-ATPase* e *PPase*), cria um gradiente de prótons e gera um potencial de membrana que é utilizado no transporte de compostos contra a sua concentração ou gradiente eletroquímico (Gaxiola *et al.*, 2007) e este transporte é assegurado pelos transportadores e canais de  $\text{Ca}^{2+}$ . No âmbito desta tese foram analisados três genes da família dos transportadores *CAX* (Figura 17). Neste estudo foi possível detetar diferenças significativas no nível de acumulação de transcrito ao longo do tempo para o *CAX3*, sendo no terceiro período de colheita e nas amostras correspondentes ao tratamento com excesso de  $\text{K}^+$  onde se verificou um aumento da

expressão de cerca de 8x. Relativamente ao *CAX5*, apesar da inexistência de diferenças significativas, é visível um aumento da expressão entre os períodos de colheita 1 e 2 nas amostras associadas ao deficit e excesso de K sendo o controlo (6,15 mmol L<sup>-1</sup>) estável; o *CAX6* apresentou uma tendência crescente do nível de transcrito no tratamento com excesso de K (10,15 mmol L<sup>-1</sup>), atingindo o nível mais elevado no terceiro período de colheita. A expressão do gene *CAX3* apresentou o mesmo padrão de comportamento crescente em função das doses de K encontrado para o teor de Ca nos frutos, sendo a dose 10,15 mmol L<sup>-1</sup> a responsável pela maior expressão deste gene e maior teor de Ca total nos frutos (Figura 18). Os resultados encontrados no presente ensaio estão de acordo com Shiratake *et al.* (1997), que ao trabalharem com a planta *A. thaliana* mantida sob condições de salinidade, verificaram que a expressão do gene *CAX1* aumentava na presença de sal concluindo que esse gene estava envolvido na resposta da planta a condições de *stress* salino.

A elevada expressão dos genes *CAXs* foi associada a tecidos não saudáveis devido a deficiência em Ca em maçãs (De Freitas *et al.*, 2010). Em tomates, a maior expressão do gene da família *CAX* foi associada a promoção de desordens fisiológicas, como a podridão da flor, comum em tomateiros deficientes em Ca, mesmo estas plantas apresentando um aumento no teor total de Ca nos frutos em relação às plantas não deficientes (Park *et al.*, 2005). Neste ensaio, a maior expressão do gene *CAX3* foi no período de colheita em que os frutos apresentaram maior teor deste elemento (Figura 18). Apesar das plantas e frutos deste ensaio não terem apresentado nenhum sintoma de desordem fisiológica e/ou deficiência de Ca (dados não apresentados), a alta expressão do gene *CAX3* nos frutos com maior teor em Ca sugere que a expressão deste transportador pode ter alterado a homeostase de Ca<sup>2+</sup>, aumentando os grupos de Ca<sup>2+</sup> no apoplasto dos organelos que pode resultar em maior permeabilidade à membrana e desenvolvimento de deficiência de Ca nos tecidos vegetais (Hirschi, 1999).

Ainda que não sejam detetadas diferenças significativas entre tratamentos, é interessante verificar que o padrão de expressão identificado para os três genes *CAX* no período de colheita 1 é comum a outros genes, incluindo a *V-ATPase*, *CaATPase1*, 3, 4 e 11 (Figura 17).

Relativamente aos 5 genes que codificam as *CaATPases* foi possível identificar um padrão comum a quatro destes: *CaATPase1*, 3, 4 e 11. Apesar das diferenças significativas serem visíveis apenas no caso da *CaATPase4* no terceiro período de colheita, pode propor-se um mecanismo de co-regulação destes quatro genes. Neste padrão a expressão dos genes associada ao *stress* aumenta do período 1 para o 2 sendo estável na condição controlo (6,15 mmol L<sup>-1</sup> de K). Este comportamento faz com

que no período 1, a expressão que no controle era superior passe a ser inferior ao nível de transcrito observado nas duas condições de *stress* no período 2. A expressão do gene *Ca-ATPase4* parece ser mais influenciada pelas diferentes doses de K, sendo apenas neste gene obtidas diferenças significativas. Essas diferenças foram visíveis no terceiro período de colheita, sendo a dose 6,15 mmol L<sup>-1</sup> de K a que permitiu uma maior expressão do gene *Ca-ATPase4*. Para além disso, houveram diferenças na expressão do gene *Ca-ATPase4* em função dos períodos de colheita para a dose 2,15 mmol L<sup>-1</sup> de K, sendo o segundo período de colheita (período 2) onde este gene mais se expressou nos frutos. A maior expressão deste gene pode resultar num maior nível de proteína *Ca-ATPase4*, o que pode favorecer o bombeamento do Ca<sup>2+</sup> para o interior do vacúolo dos morangos, como sugerido por De Freitas *et al.* (2010). Neste organelo, o Ca<sup>2+</sup> forma complexo com fenóis, oxalatos e fosfatos (White e Broadley, 2003), reduzindo o Ca<sup>2+</sup> livre na região do apoplasto, necessário para a estruturação e manutenção da integridade da membrana plasmática (Marschner, 2012). Segundo De Freitas *et al.* (2010), o decréscimo na concentração do Ca<sup>2+</sup> livre no apoplasto implica um aumento da permeabilidade da membrana plasmática e maior probabilidade de ocorrência de *bitter pit* em maçãs. No presente estudo, embora a expressão do gene *Ca-ATPase4* pareça ser influenciada pelas diferentes doses de K e períodos de colheita, nenhum distúrbio fisiológico foi visualizado nos morangos.

Para o gene *Ca-ATPase2* (Figura 17), mesmo não havendo diferenças estatísticas significativas, observou-se um padrão crescente na expressão deste gene em função das diferentes doses de K, o qual se manteve nos três períodos de colheita. Este comportamento sugere, que o aumento da disponibilidade K aumenta a expressão deste gene nos morangos independente do desenvolvimento da planta no período de produção de frutos.

#### **4. Conclusões**

Os resultados obtidos indicam que as diferentes doses de K disponibilizadas no meio de crescimento dos morangueiros cv. San Andreas, associado ao tempo de exposição a essa condição, parecem exercer uma influência na expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no movimento do Ca<sup>2+</sup> na célula. Quatro dos dez genes estudados apresentaram expressão diferencial considerando as diferentes doses de K disponibilizadas às plantas e o período de colheita. Tal resultado indica que a nutrição da planta com doses desadequadas de K, seja em deficit, seja em excesso, poderá conduzir a alterações na qualidade dos frutos estando o Ca<sup>2+</sup> e os mecanismos associados ao seu movimento na célula aqui implicados.

## Capítulo IV

---



## Avaliação da qualidade e conservação pós-colheita do morango (*Fragaria x ananassa* Dutch. cv. Portola) tratado com CaCl<sub>2</sub> em pré-colheita

---

### 1. Introdução

A conservação pós-colheita é um dos grandes problemas na cadeia produtiva do morango. Por ser fruto não climatérico, a colheita é realizada quando os morangos apresentam um grau de maturação com as características de cor, sabor e aroma em condições ótimas de aceitabilidade pelo consumidor. Além disso, o facto destes frutos apresentarem uma epiderme muito macia, resulta num curto período de conservação devido a sua facilidade de deterioração.

A deterioração dos morangos é resultante da sua intensa atividade metabólica e grande suscetibilidade à lesão mecânica, o que reduz de forma considerável sua vida útil pós-colheita, acarretando perdas nutricionais, sensoriais e económicas consideráveis (Chitarra e Chitarra, 2005). O uso da refrigeração é eficiente na redução da taxa metabólica dos frutos em geral. No entanto, a refrigeração de forma isolada não é suficiente para manter a qualidade dos morangos, sendo necessário o uso de outras técnicas de conservação conjugadas, como o acondicionamento em atmosfera modificada (Bhat e Stamminger, 2016; Sogvar *et al.*, 2016; Giuggioli *et al.*, 2017; Jalali *et al.*, 2017) e o uso de biofilmes ou ceras (Khalifa *et al.*, 2016a; Khalifa *et al.*, 2016b; Briano *et al.*, 2017; Oregel-Zamudio *et al.*, 2017). A estes procedimentos acrescem a imersão pós-colheita (Souza *et al.*, 1999; Lara *et al.*, 2004; Verdini *et al.*, 2008; Galetto *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011b) e a pulverização pré-colheita dos morangos com produtos à base de cálcio (Vance *et al.*, 2017).

A utilização do cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) na epiderme dos morangos é proposta como economicamente viável e com potencial para manutenção da qualidade pós-colheita, além de não conferir sabor, odor e cor aos frutos (Souza *et al.*, 1999; Hernández-Muñoz *et al.*, 2008; Galetto *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011b). De entre os principais efeitos desejáveis da aplicação de CaCl<sub>2</sub> nos frutos está o controlo de distúrbios fisiológicos, a redução da taxa respiratória, o aumento da firmeza e a redução do crescimento de fungos durante o armazenamento (Akhtar *et al.*, 2010; Senevirathna e Daundasekera, 2010; Hornedo-Ortega *et al.*, 2016). Todos estes efeitos contribuem para a extensão do período de conservação.

Chen *et al.* (2011b) ao investigarem os efeitos da aplicação das concentrações 0; 1 e 4 % de CaCl<sub>2</sub> em morangos conservados a 4 °C durante 15 dias, observaram que a aplicação de 1 % de CaCl<sub>2</sub> atrasou as mudanças das propriedades físico-químicas

dos frutos, bem como a degradação das pectinas. Assim, os autores sugeriram que o  $\text{CaCl}_2$  prolongaria a vida útil dos morangos, principalmente por influenciar a degradação das moléculas de pectina. Lara *et al.* (2004) também observaram que a aplicação da concentração de 1 % de  $\text{CaCl}_2$  reduziu o ataque de fungos, retardou a maturação dos frutos e manteve a integridade da parede celular dos morangos.

Para além dos efeitos citados, Hernández-Muñoz *et al.* (2008) concluíram que a aplicação de  $\text{CaCl}_2$  proporcionou melhor aparência, menor perda de massa fresca, maior teor de sólidos solúveis e pH dos morangos, além do incremento no valor nutricional dos frutos.

Assim, face ao potencial de utilização do  $\text{CaCl}_2$  na manutenção da qualidade e no prolongamento da conservação pós-colheita dos morangos e também face à carência de estudos no qual se refere a aplicação de  $\text{CaCl}_2$  em pré-colheita nos frutos do morangueiro, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do número de aplicações de diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  nos frutos em pré-colheita, no que respeita à manutenção da qualidade e conservação dos morangos, quantificando as possíveis modificações físicas, químicas e microbiológicas durante o seu armazenamento. Foi também analisado o teor de cálcio da parede celular dos frutos, na tentativa de perceber se as aplicações resultariam em teores mais elevados deste catião na parede celular.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Localização, material vegetal e instalação do ensaio**

O ensaio ocorreu numa estufa da exploração comercial produtora de morangos PaxBerry Portugal, situada em Monte dos Meloais, Quintos, Beja – Portugal, cujas coordenadas geográficas são 37°58'09.3"N 7°46'00.4"W.

O sistema de produção empregado na estufa foi o hidropónico *New Growing System*<sup>®</sup> (NGS) totalmente automatizado, com regas diárias alternadas entre água e solução nutritiva contendo todos os macro e micronutrientes essenciais ao desenvolvimento do morangueiro, com pH e CE ajustados em  $6,75 \pm 0,25$  e  $2,2 \pm 0,3$  dS  $\text{m}^{-1}$ , respetivamente. Os morangueiros utilizados neste ensaio foram mantidos sob as mesmas condições dos demais da exploração.

A cultivar utilizada foi a Portola, cujas plantas de raiz nua obtidas de viveiro certificado foram plantadas no dia 28 de setembro de 2015. Foram utilizadas duas linhas de cultivo com 4 metros, cada linha dividida em 9 blocos ao acaso, cada bloco com 68



plantas, totalizando 612 plantas para aplicação dos tratamentos e colheita dos morangos.

## 2.2. Tratamentos e condução do ensaio

Os tratamentos consistiram em uma ou duas aplicações de três concentrações de cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , com 76 % de  $\text{CaCl}_2$ ) do tipo aditivo alimentar nos morangos em pré-colheita.

Foram testadas as seguintes concentrações:

Concentração 1 – 0 %  $\text{CaCl}_2$  (0 % de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) – controlo;

Concentração 2 – 1 %  $\text{CaCl}_2$  (1,32 % de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ );

Concentração 3 – 4 %  $\text{CaCl}_2$  (5,26 % de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ );

As diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  foram preparadas através da dissolução do sal em água destilada a temperatura ambiente e agitação constante em agitador magnético. A concentração de 0 % de  $\text{CaCl}_2$  foi composta apenas por água destilada. Os tratamentos foram iniciados no dia 21 de março e 01 de abril de 2016, para plantas que receberam 1 e 2 aplicações, respetivamente. Nestas datas, os morangos apresentavam-se verdes nos primeiros estádios de desenvolvimento, após a fecundação do ovário.

Os morangos que receberam uma única aplicação das diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  foram colhidos 8 dias após os tratamentos e os que receberam duas, estas foram realizadas 11 e 4 dias antes da colheita. As aplicações foram efetuadas por meio de pulverizações a uma distância de aproximadamente 30 cm das plantas, direcionada aos morangos com pulverizador de pressão prévia manual, com capacidade para 4L e com boquilha do tipo universal, uma pressão de funcionamento de 2,5 – 4,5 bar.

Após cada colheita, os morangos foram transportados para o Laboratório de Tecnologia e Pós-Colheita da Universidade de Évora onde foram selecionados atendendo à ausência de defeitos fisiológicos e danos, tamanho médio (peso médio de 24 g) e cor (pelo menos com  $\frac{3}{4}$  da superfície com coloração vermelha, sendo este o critério utilizado para a colheita de morangos para consumo *in natura*). Posteriormente, foram acondicionados em caixas de papel cartão (60 x 40 x 10) previamente identificadas e armazenados em câmara de frio sob condições de  $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura e 95 % de humidade relativa.

Foram realizadas 7 avaliações físicas e químicas dos morangos no decorrer dos dias de conservação para todos os tratamentos com 1 ou 2 aplicações de  $\text{CaCl}_2$ . As avaliações tiveram início no dia 0 (dia da colheita) e término após 8 dias de conservação

em câmara de frio. Cada avaliação incidu sobre 21 morangos retirados aleatoriamente das caixas de papel cartão contendo os morangos de cada tratamento. Estes foram deixados repousar a temperatura ambiente de 20 °C por aproximadamente 3 horas antes do início das avaliações. As avaliações químicas do teor de Ca total e teor de Ca presente na parede celular (AIR) dos morangos foram realizadas somente nos dias 0, 3 e 8 de conservação.

### **2.3 Análises físicas e químicas dos morangos**

As análises referentes à firmeza, aos parâmetros da cor ( $L^*$ ,  $h^0$  e  $C^*$ ), aos sólidos solúveis totais (SST), à acidez titulável (AT), ao pH e à razão SST/AT foram realizadas conforme a metodologia descrita no Material e Métodos do Ensaio II – 2.12.3 *Avaliação da qualidade físico-química dos morangos*.

#### ***Determinação do teor de Ca total nos morangos***

Para a determinação do teor de Ca total foram preparadas 2 amostras compósitas de morangos de cada concentração e número de aplicações de  $\text{CaCl}_2$  nos dias 0, 3 e 8 de conservação. Estas amostras consistiram na utilização de  $\frac{1}{4}$  de quatro morangos escolhidos ao acaso entre os 21 previamente congelados a -20 °C. A forma como as amostras foram manipuladas para a determinação do teor de Ca total nos morangos foi descrita no Material e Métodos do Ensaio I - 2.6.3 *Avaliação do teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta (Teor em Ca, K e Mg total nos morangos)*.

#### ***Extração e teor de Ca na parede celular dos morangos***

O AIR foi extraído a partir das 21 partes restantes de morangos para as diferentes concentrações e número de aplicações de  $\text{CaCl}_2$  nos dias 0, 4 e 8 de conservação. A forma como as amostras foram manipuladas para a extração e determinação do teor de Ca na parede celular dos morangos foi descrita no Material e Métodos do Ensaio I - 2.6.3 *Avaliação do teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta (Extração e teor em Ca, K e Mg na parede celular dos morangos)*.

### **2.4 Quantificação da deterioração dos morangos à temperatura ambiente**

A deterioração da epiderme dos morangos foi quantificada nas amostras sujeitas a duas aplicações das diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  por inspeção visual, através da contagem do número de danos e da presença de fungos.

Foram individualizados 15 morangos por tratamento, em que três conjuntos de 5 morangos foram colocados em prato de plástico de 25 mm do tipo descartável, mantidos à luz natural e temperatura ambiente de 22 °C a partir do dia em que foram colhidos. Os morangos que apresentaram qualquer sinal de danos e/ou desenvolvimento de micélio na epiderme foram considerados deteriorados.

Os resultados foram expressos como percentagem (%) de morangos deteriorados para os dias 3, 5 e 8 após a colheita.

## **2.5 Desenho experimental e análise estatística dos dados**

O delineamento experimental utilizado foi um fatorial 2 x 3, com 1 ou 2 aplicações de CaCl<sub>2</sub> e 3 concentrações de CaCl<sub>2</sub>, em blocos ao acaso com repetições.

Com exceção do parâmetro de deterioração dos morangos, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (Anova) e comparação de médias realizada pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Foi realizada a análise de correlação de Pearson ( $p \leq 0,05$ ), entre os parâmetros físico-químicos. A tabela contendo a matriz de correlação entre os parâmetros avaliados esta apresentada em Anexo 4, tabela 1 e 2. Para todas as análises e testes mencionados, foi utilizado o programa estatístico SPSS® for Windows, Statistic version 24 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.).

## **3. Resultados e discussão**

### **3.1 Efeito do CaCl<sub>2</sub> nos atributos físicos e químicos da qualidade dos morangos**

A firmeza em frutos é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a qualidade em função do tempo de conservação. Em geral, neste ensaio, a firmeza dos morangos não foi influenciada pelas concentrações e pelo número de aplicações de CaCl<sub>2</sub> estudadas (Tabela 25).

**Tabela 25.** Variação média da firmeza (N) dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> em pré-colheita.

com 1 aplicação de CaCl <sub>2</sub>							
Tratamentos	Dias de conservação						
	0	1	2	3	6	7	8
Controlo	1,64 ± 0,07aA	1,57 ± 0,10aA	1,59 ± 0,11aA	1,67 ± 0,15aA	1,69 ± 0,08aA	1,48 ± 0,07 bA	1,72 ± 0,07aA
1% CaCl <sub>2</sub>	1,47 ± 0,08aA	1,75 ± 0,11aA	1,73 ± 0,10aA	1,57 ± 0,09aA	1,73 ± 0,08aA	1,74 ± 0,1abA	1,69 ± 0,09aA
4% CaCl <sub>2</sub>	1,50 ± 0,12aA	1,61 ± 0,08aA	1,53 ± 0,11aA	1,59 ± 0,09aA	1,52 ± 0,07aA	1,91 ± 0,12aA	1,76 ± 0,12aA

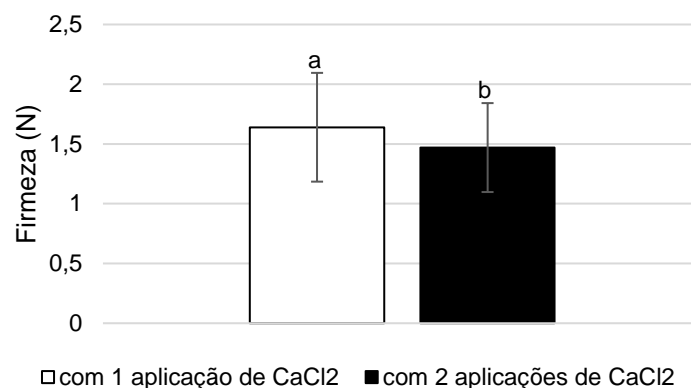
  

com 2 Aplicações CaCl <sub>2</sub>							
Tratamentos	Dias de conservação						
	0	1	2	3	4	7	8
Controlo	1,34 ± 0,09aA	1,50 ± 0,19aA	1,36 ± 0,06aA	1,52 ± 0,09aA	1,55 ± 0,06aA	1,31 ± 0,07bA	1,47 ± 0,1aA
1% CaCl <sub>2</sub>	1,50 ± 0,08aA	1,58 ± 0,26aA	1,30 ± 0,05aA	1,52 ± 0,07aA	1,48 ± 0,07aA	1,33 ± 0,09bA	1,32 ± 0,06aA
4% CaCl <sub>2</sub>	1,53 ± 0,10aA	1,56 ± 0,28aA	1,49 ± 0,07aA	1,70 ± 0,07aA	1,40 ± 0,07aA	1,65 ± 0,11aA	1,49 ± 0,09aA

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A influência do CaCl<sub>2</sub> neste ensaio não ficou evidente, visto que a firmeza dos morangos das amostras controlo foi semelhante aos morangos submetidos aos tratamentos em que o CaCl<sub>2</sub> foi adicionado. Resultados semelhantes foram encontrados por Chen *et al.* (2011b) ao estudar as concentrações 0, 1 e 4 % de CaCl<sub>2</sub> aplicados em morangos da cv. Shijixiang após a colheita. No entanto, para maçãs (Kittemann *et al.*, 2009; Zhao e Wang, 2015), damasco (Koushesh Saba *et al.*, 2016) e papaia (Madani *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015), a aplicação de CaCl<sub>2</sub> mostrou-se efetiva na manutenção da firmeza dos frutos, ao longo do tempo de conservação.

Para ambas as aplicações de CaCl<sub>2</sub>, houve efeito entre as diferentes concentrações somente no sétimo dia de conservação, sendo a concentração 4 % de CaCl<sub>2</sub> a que apresentou morangos mais firmes. Em geral, houve uma tendência dos morangos tratados com 1 aplicação de CaCl<sub>2</sub> apresentarem valores de firmeza ligeiramente superiores aos tratados com 2 aplicações de CaCl<sub>2</sub> (Figura 19).



**Figura 19.** Variação média geral da firmeza (N) dos morangos cv. Portola em função do número de aplicações de CaCl<sub>2</sub>. Médias e erros padrão, seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente entre si, a 1 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Segundo Døving *et al.* (2005), a firmeza em morangos apresenta uma grande variabilidade natural. Os valores para firmeza encontrado no presente estudo, que variaram entre 1,3 e 1,91 N estão de acordo com estes autores, que após estudarem 400 morangos de quatro cultivares obtiveram valores de firmeza que variaram entre 0,41 e 3,19 N.

Assim, por não terem ocorrido diferenças entre as concentrações de CaCl<sub>2</sub> para quase todos os dias de conservação, esta redução na firmeza dos morangos tratados com 2 aplicações, além de poder ter ocorrido devido ao comportamento natural dos frutos, pode estar relacionada com o grau de maturação em que estes foram colhidos, uma vez que o único critério utilizado na colheita foi a cor dos frutos.

A cor forte e brilhante é a primeira influência de atratividade na escolha do morango pelo consumidor. Os parâmetros da cor mensurados neste ensaio (L\*, h<sup>0</sup> e C\*) foram claramente influenciados pelos dias de conservação e pouco influenciados pelas concentrações de CaCl<sub>2</sub> (Tabela 26).

**Tabela 26.** Variação média dos parâmetros da cor L\*, h° e C\* dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> em pré-colheita.

com 1 aplicação de CaCl <sub>2</sub>							
Dias de conservação							
Tratamentos	0	1	2	3	6	7	8
<b>L*</b>							
<b>Controlo</b>	47,68 ± 0,8aA	42,40 ± 0,7aB	42,31 ± 0,7aB	40,60 ± 0,3aBC	38,82 ± 0,5aC	41,33 ± 0,5aBC	41,78 ± 0,6aB
<b>1% CaCl<sub>2</sub></b>	47,80 ± 0,7aA	41,96 ± 0,6aB	42,17 ± 0,7aB	41,49 ± 0,7aB	39,40 ± 0,7aB	41,47 ± 0,6aB	41,45 ± 0,7aB
<b>4% CaCl<sub>2</sub></b>	44,57 ± 0,8bA	43,09 ± 0,6aAB	41,84 ± 0,7aAB	41,07 ± 0,5aB	40,74 ± 0,6aB	40,71 ± 0,7aB	42,88 ± 0,6aAB
<b>h°</b>							
<b>Controlo</b>	0,81 ± 0,20aA	0,75 ± 0,15aB	0,76 ± 0,16aAB	0,71 ± 0,01aBC	0,67 ± 0,01bC	0,73 ± 0,11aB	0,74 ± 0,12aB
<b>1% CaCl<sub>2</sub></b>	0,82 ± 0,14aA	0,75 ± 0,15aAB	0,75 ± 0,16aBC	0,71 ± 0,01aBC	0,69 ± 0,13abC	0,73 ± 0,14aBC	0,73 ± 0,19aBC
<b>4% CaCl<sub>2</sub></b>	0,74 ± 0,17bA	0,75 ± 0,14aA	0,73 ± 0,16aA	0,71 ± 0,02aA	0,72 ± 0,13aA	0,73 ± 0,17aA	0,77 ± 0,16aA
<b>C*</b>							
<b>Controlo</b>	46,59 ± 0,6aA	44,93 ± 0,6aAB	43,77 ± 0,5bB	45,28 ± 0,6aAB	44,13 ± 0,5aB	44,05 ± 0,4abB	44,10 ± 0,6abB
<b>1% CaCl<sub>2</sub></b>	47,84 ± 0,5aA	46,22 ± 0,5abAB	44,94 ± 0,6abB	45,12 ± 0,5aB	44,98 ± 0,5aB	45,25 ± 0,5aB	44,95 ± 0,4aB
<b>4% CaCl<sub>2</sub></b>	47,75 ± 0,5aA	47,01 ± 0,6aA	45,69 ± 0,5aA	46,03 ± 0,5aA	45,36 ± 0,8aAB	43,18 ± 0,6bB	43,21 ± 0,5bB
com 2 Aplicações de CaCl <sub>2</sub>							
Dias de conservação							
Tratamentos	0	1	2	3	4	7	8
<b>L*</b>							
<b>Controlo</b>	42,70 ± 0,44aA	41,07 ± 0,62abA	41,77 ± 0,42aA	41,73 ± 0,75aA	41,76 ± 0,52aA	41,20 ± 0,58aA	41,99 ± 0,51aA
<b>1% CaCl<sub>2</sub></b>	41,93 ± 0,49aA	41,89 ± 0,52aA	40,00 ± 0,58bA	40,65 ± 0,36aA	40,07 ± 0,60aA	39,95 ± 0,46aA	41,76 ± 0,51aA
<b>4% CaCl<sub>2</sub></b>	42,59 ± 0,50aA	39,38 ± 0,51bB	40,15 ± 0,53abB	40,59 ± 0,57aAB	40,77 ± 0,53aAB	40,49 ± 0,52aAB	41,55 ± 0,61aAB

	<b>h°</b>						
<b>Controlo</b>	0,75 ± 0,01aA	0,70 ± 0,01bB	0,73 ± 0,01aAB	0,72 ± 0,01aAB	0,74 ± 0,01aAB	0,71 ± 0,01aAB	0,74 ± 0,01aAB
<b>1% CaCl<sub>2</sub></b>	0,75 ± 0,01aA	0,74 ± 0,01aA	0,71 ± 0,01aA	0,71 ± 0,01aA	0,71 ± 0,01aA	0,71 ± 0,01aA	0,75 ± 0,01aA
<b>4% CaCl<sub>2</sub></b>	0,77 ± 0,01aA	0,71 ± 0,02abBC	0,70 ± 0,01aC	0,71 ± 0,01aBC	0,73 ± 0,01aABC	0,73 ± 0,01aABC	0,76 ± 0,01aAB
	<b>C*</b>						
<b>Controlo</b>	48,21 ± 0,5aA	48,32 ± 0,7aA	48,69 ± 0,5aA	47,27 ± 0,5aAB	46,99 ± 0,5aAB	45,390 ± 0,6aB	46,60 ± 0,4aAB
<b>1% CaCl<sub>2</sub></b>	48,16 ± 0,6aA	47,92 ± 0,6aA	46,49 ± 0,6aAB	47,86 ± 0,6aA	46,15 ± 0,7aAB	44,80 ± 0,4aB	46,81 ± 0,6aAB
<b>4% CaCl<sub>2</sub></b>	47,64 ± 0,5aA	45,25 ± 0,6bAB	47,74 ± 0,8aA	47,07 ± 0,4aAB	46,06 ± 0,5aAB	44,79 ± 0,6aB	45,00 ± 0,7aB

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Nos morangos que receberam 1 aplicação de  $\text{CaCl}_2$ , houve redução da luminosidade ( $L^*$ ) a partir do primeiro dia de conservação. Contudo, a presença do Ca não influenciou esta redução, uma vez que o mesmo comportamento foi observado para as amostras controle. Nos morangos que receberam 2 aplicações, a redução da  $L^*$  foi observada nos morangos tratados com 4% de  $\text{CaCl}_2$ . Neste caso, a  $L^*$  pode ter sido reduzida devido o excesso da concentração de Ca na epiderme do morango ou pelo efeito tóxico que esta concentração pode ter causado aos frutos.

Ao estudarem o comportamento das componentes da cor,  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  na epiderme de morangos, Paraskevopoulou-Paroussi *et al.* (1993) e Miszczak *et al.* (1995) concluíram que estes valores diminuem em função do tempo de conservação devido a processos fisiológicos da maturação que causam o escurecimento dos frutos. Resultados semelhantes foram encontrados neste ensaio para os frutos que receberam 1 aplicação de  $\text{CaCl}_2$  para o parâmetro  $h^0$ , que define a intensidade da cor por meio da relação  $b^*/a^*$ . Nestes morangos, o  $h^0$  apresentou correlação positiva ( $p \leq 0,01$ ,  $r \geq 0,80$ ) com o  $L^*$  para todas as concentrações de  $\text{CaCl}_2$  estudadas (Anexo 4 – Tabela 1).

Para os morangos tratados com 2 aplicações, a concentração de 1 % de  $\text{CaCl}_2$  apresentou  $h^0$  e  $C^*$  constantes durante os dias de conservação. Valores semelhantes de  $h^0$  e  $C^*$ , indicam que a cor vermelha se manteve durante a conservação e praticamente não houve escurecimento dos morangos independentemente do dia em que os mesmos foram colhidos. Esta manutenção da cor durante os dias de conservação é uma característica interessante, uma vez que o escurecimento excessivo dos morangos pode influenciar a aceitação do morango *in natura* pelo consumidor. Correlações positivas entre  $h^0$  e  $L^*$  para os morangos que receberam 2 aplicações foram também observadas para todas as concentrações de  $\text{CaCl}_2$  estudadas ( $p \leq 0,01$ ,  $r \geq 0,78$ ) (Anexo 4 – Tabela 2).

Os valores médios encontrados neste ensaio para as componentes da cor são ligeiramente superiores aos mencionados por Shaw e Larson (2009) na descrição e caracterização da cv. Portola, em que os valores de  $L^*$  variaram entre 31,4 e 37,2;  $h^0$  entre 0,43 e 0,52; e  $C^*$  entre 37,77 e 44,9. A ocorrência deste tipo de variação tanto nas características físicas quanto químicas dos morangos é normal, em virtude, principalmente, das condições ambientais do local de cultivo.

Os resultados obtidos para o teor em SST nos morangos dos diferentes tratamentos e dias de conservação encontram-se na Tabela 27. Os valores encontrados neste ensaio estão próximos do valor médio de 6,68 °Brix encontrados por Ruan *et al.* (2013) para morangos da mesma cultivar.



**Tabela 27.** Variação média dos SST ( $^{\circ}$ Brix) dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  em pré-colheita.

Com 1 aplicação de $\text{CaCl}_2$							
Dias de conservação							
Tratamentos	0	1	2	3	6	7	8
Controlo	4,80 $\pm$ 0,1aC	5,55 $\pm$ 0,08aABC	4,90 $\pm$ 0,01aBC	6,15 $\pm$ 0,55aAB	6,60 $\pm$ 0,01aA	5,25 $\pm$ 0,05aBC	5,05 $\pm$ 0,05aBC
1% $\text{CaCl}_2$	4,55 $\pm$ 0,05aA	5,00 $\pm$ 0,06aA	5,25 $\pm$ 0,11aA	5,70 $\pm$ 0,01aA	5,90 $\pm$ 0,06aA	6,20 $\pm$ 0,40aA	5,60 $\pm$ 0,70aA
4% $\text{CaCl}_2$	4,60 $\pm$ 0,1aC	5,55 $\pm$ 0,11aAB	5,45 $\pm$ 0,10aAB	5,85 $\pm$ 0,05aA	5,80 $\pm$ 0,09aA	5,25 $\pm$ 0,05aAB	4,50 $\pm$ 0,20aC
com 2 Aplicações $\text{CaCl}_2$							
Dias de conservação							
Tratamentos	0	1	2	3	4	7	8
Controlo	5,35 $\pm$ 0,1aB	7,00 $\pm$ 0,1aAB	6,25 $\pm$ 0,2aAB	7,15 $\pm$ 0,5aA	5,95 $\pm$ 0,2aAB	7,15 $\pm$ 0,1aA	6,00 $\pm$ 0,4aAB
1% $\text{CaCl}_2$	6,00 $\pm$ 0,1aA	5,90 $\pm$ 0,1bA	6,30 $\pm$ 0,6aA	6,75 $\pm$ 0,05aA	6,25 $\pm$ 0,2aA	5,80 $\pm$ 0,4abA	5,60 $\pm$ 0,1aA
4% $\text{CaCl}_2$	5,45 $\pm$ 0,2aBC	5,45 $\pm$ 0,05bBC	6,45 $\pm$ 0,1aAB	7,20 $\pm$ 0,3aA	5,45 $\pm$ 0,1aBC	5,30 $\pm$ 0,2bBC	4,90 $\pm$ 0,4aC

Médias e erros padrão seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Não houve efeito das diferentes concentrações de Ca nos SST dos morangos que receberam 1 aplicação de CaCl<sub>2</sub>. Nos que receberam 2 aplicações de CaCl<sub>2</sub>, o comportamento manteve-se para a maioria dos dias de conservação, com exceção do dia 1 e 7 em que houve redução nos SST em função da aplicação de Ca.

Resultados semelhantes foram encontrados por Souza *et al.* (1999) em morangos cv. Sequóia tratados com as mesmas concentrações de CaCl<sub>2</sub> deste ensaio, durante 21 dias de conservação.

A utilização da concentração de 1 % de CaCl<sub>2</sub> em 1 ou 2 aplicações, ao contrário das demais concentrações, não influenciou os SST dos morangos durante os dias de conservação. Estes resultados contradizem os encontrados por Chen *et al.* (2011b) em que os morangos da cv. Shijixiang tratados com 1 % de CaCl<sub>2</sub> apresentaram valores de SST significativamente mais baixos do que nas demais concentrações após 5 dias e 15 dias de conservação.

A diferença na resposta dos frutos à concentração de 1 % de CaCl<sub>2</sub> encontrados neste ensaio e as obtidas por Chen *et al.* (2011b), pode ser devido à utilização de cultivares diferentes, com diferente extensão do processo de maturação (Cordenunsi *et al.*, 2003; Mahmud *et al.*, 2008) e por isso diferente acumulação de polissacarídeos (Nogata *et al.*, 1993).

A acidez titulável (AT) que expressa a porcentagem do ácido cítrico predominante em morangos, não foi afetada pelas concentrações de CaCl<sub>2</sub> em ambas aplicações e sofreu poucas alterações no decorrer dos dias de conservação (Tabela 28).

As concentrações e número de aplicações de CaCl<sub>2</sub> também não influenciaram o pH dos morangos (Tabela 29); no entanto, observaram-se ligeiras reduções a partir dos primeiros dias de conservação. Este comportamento não foi observado para os frutos que receberam 2 aplicações das concentrações 1 e 4 % de CaCl<sub>2</sub>. Nestes tratamentos, não houve variação do pH em função do tempo de conservação.

Apesar da AT e pH terem sido mensurados em amostra compósita com número expressivo de frutos, estas leituras foram realizadas somente em duas repetições por tratamento. Assim não se pode chegar a uma conclusão sobre o efeito das concentrações e número de aplicações de CaCl<sub>2</sub> para estes parâmetros nos morangos deste ensaio. No entanto, estes resultados foram importantes para caracterizar a AT e o pH dos morangos tratados e estão de acordo com os valores encontrados para AT e pH para a mesma cultivar por Antunes *et al.* (2014) e Cecatto *et al.* (2013), respectivamente.

A razão entre SST/AT é um parâmetro importante na determinação do grau de maturação dos frutos e é uma das informações que mais traduz o sabor, que é representado principalmente pelo equilíbrio entre doçura e acidez aceitável para o palato humano (Souza *et al.*, 1999). Os resultados obtidos para o teor SST/AT em função dos dias de conservação para as concentrações e número de aplicação de  $\text{CaCl}_2$  encontram-se na Tabela 30.

**Tabela 28.** Variação média da AT (% de ácido cítrico) dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> em pré-colheita.

com 1 aplicação de CaCl <sub>2</sub>							
Dias de conservação							
Tratamentos	0	1	2	3	6	7	8
Controlo	0,58 ± 0,005aA	0,69 ± 0,05aA	0,64 ± 0,01aA	0,66 ± 0,04aA	0,69 ± 0,005aA	0,65 ± 0,02aA	0,63 ± 0,02aA
1% CaCl <sub>2</sub>	0,58 ± 0,01aA	0,61 ± 0,01aA	0,64 ± 0,03aA	0,67 ± 0,005aA	0,71 ± 0,02aA	0,70 ± 0,04aA	0,69 ± 0,005aA
4% CaCl <sub>2</sub>	0,55 ± 0,005aB	0,66 ± 0,02aA	0,71 ± 0,01aA	0,67 ± 0,02aA	0,66 ± 0,01aA	0,69 ± 0,001aA	0,62 ± 0,03aAB
com 2 Aplicações CaCl <sub>2</sub>							
Dias de conservação							
Tratamentos	0	1	2	3	4	7	8
Controlo	0,68 ± 0,001aA	0,70 ± 0,05aA	0,67 ± 0,04aA	0,75 ± 0,02aA	0,69 ± 0,01aA	0,67 ± 0,01aA	0,67 ± 0,005aA
1% CaCl <sub>2</sub>	0,69 ± 0,01aAB	0,70 ± 0,01aAB	0,68 ± 0,06aAB	0,77 ± 0,001aA	0,71 ± 0,005aAB	0,63 ± 0,01aB	0,63 ± 0,005aB
4% CaCl <sub>2</sub>	0,70 ± 0,05aA	0,61 ± 0,01aA	0,64 ± 0,01aA	0,76 ± 0,11aA	0,60 ± 0,005bA	0,53 ± 0,06aA	0,58 ± 0,03aA

Médias e erros padrão médio seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 29.** Variação média do pH dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> em pré-colheita.

com 1 aplicação de CaCl <sub>2</sub>							
Dias de conservação							
Tratamentos	0	1	2	3	6	7	8
Controlo	3,48 ± 0,06aAB	3,45 ± 0,03aAB	3,60 ± 0,04aA	3,00 ± 0,04aC	3,10 ± 0,04aBC	3,06 ± 0,03aC	3,10 ± 0,02aBC
1% CaCl <sub>2</sub>	3,58 ± 0,01aA	3,49 ± 0,01aA	3,48 ± 0,02aA	3,00 ± 0,02aB	3,13 ± 0,04aB	3,11 ± 0,02aB	3,10 ± 0,03aBC
4% CaCl <sub>2</sub>	3,69 ± 0,01aA	3,47 ± 0,01aB	3,48 ± 0,00aB	3,02 ± 0,03aC	3,12 ± 0,04aC	3,06 ± 0,01aC	3,12 ± 0,01aC
com 2 Aplicações CaCl <sub>2</sub>							
Dias de conservação							
Tratamentos	0	1	2	3	4	7	8
Controlo	3,03 ± 0,01aB	3,23 ± 0,05aA	3,12 ± 0,03aAB	3,13 ± 0,01aAB	3,14 ± 0,01bAB	3,15 ± 0,01aAB	3,15 ± 0,01aAB
1% CaCl <sub>2</sub>	3,06 ± 0,01aA	3,15 ± 0,01aA	3,15 ± 0,01aA	3,12 ± 0,06aA	3,12 ± 0,01bA	3,15 ± 0,03aA	3,16 ± 0,01aA
4% CaCl <sub>2</sub>	3,12 ± 0,08aA	3,18 ± 0,01aA	3,18 ± 0,01aA	3,09 ± 0,03aA	3,20 ± 0,01aA	3,19 ± 0,04aA	3,19 ± 0,01aA

Médias e erros padrão médio seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 30.** Variação média do teor de SST/AT dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> em pré-colheita.

com 1 aplicação de CaCl <sub>2</sub>							
Dias de conservação							
Tratamentos	0	1	2	3	6	7	8
Controlo	8,35 ± 0,3aABC	8,13 ± 0,3aBC	7,66 ± 0,01aC	9,30 ± 0,3aAB	9,64 ± 0,1aA	8,02 ± 0,2bBC	8,03 ± 0,3aBC
1% CaCl <sub>2</sub>	7,85 ± 0,2aA	8,19 ± 0,2aA	8,18 ± 0,5aA	8,57 ± 0,1aA	8,39 ± 0,60aA	8,92 ± 0,01aA	8,18 ± 0,9aA
4% CaCl <sub>2</sub>	8,44 ± 0,3aAB	8,40 ± 0,3aAB	7,68 ± 0,04aAB	8,81 ± 0,4aA	8,78 ± 0,3aA	7,61 ± 0,07bAB	7,32 ± 0,09aB
com 2 Aplicações CaCl <sub>2</sub>							
Dias de conservação							
Tratamentos	0	1	2	3	4	7	8
Controlo	7,86 ± 0,22aB	10,02 ± 0,43aAB	9,33 ± 0,04aAB	9,59 ± 0,54aAB	8,63 ± 0,49aAB	10,67 ± 0,06aA	9,02 ± 0,53aAB
1% CaCl <sub>2</sub>	8,76 ± 0,04aA	8,43 ± 0,26aA	9,24 ± 0,34aA	8,77 ± 0,06aA	8,86 ± 0,29aA	9,30 ± 0,86aA	8,96 ± 0,23aA
4% CaCl <sub>2</sub>	7,80 ± 0,20aB	9,01 ± 0,01aAB	10,16 ± 0,16aA	9,54 ± 0,61aAB	9,16 ± 0,33aAB	10,09 ± 0,76aA	8,51 ± 0,18aAB

Médias e erros padrão médio seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O efeito da utilização do Ca só foi observado no 7º dia de conservação nos morangos que receberam 1 aplicação das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub>. No entanto, houve variação no teor de SST/AT durante os dias de conservação para os morangos do controlo e da concentração 4% de CaCl<sub>2</sub> em ambas aplicações.

Os valores observados para a razão SST/AT neste ensaio variaram entre 7,32 e 10,16, e que foi inferior ao valor médio de 11,09 encontrado por Cecatto *et al.* (2013) estudando a mesma cultivar de morangueiro em substrato orgânico. Parece que o estado de maturação dos morangos usados neste ensaio era mais imaturo que o dos morangos do referido trabalho.

### **3.2 Efeito da aplicação de CaCl<sub>2</sub> no teor de cálcio nos morangos**

O cálcio é o elemento que mais afeta a qualidade e a conservação dos frutos (Chen *et al.*, 2011b). Os efeitos fisiológicos do Ca nos frutos foram estudados extensivamente sobre as maçãs (Glenn e Poovaiah, 1990; De Freitas *et al.*, 2013; Zhao e Wang, 2015) e estes estudos mostraram que existem grandes diferenças na estrutura do tecido das maçãs com alto e baixo teor em Ca. Em morangos, a adição de Ca mostrou efeitos positivos na manutenção da qualidade pós-colheita e no valor nutritivo dos frutos (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008).

O teor de Ca total encontrado nos morangos nos diferentes tratamentos com CaCl<sub>2</sub> em função do tempo de conservação encontram-se na Tabela 31. O teor de Ca total na matéria seca dos morangos não sofreu diferenças significativas para a maioria dos dias de conservação, como era esperado.

Souza *et al.* (1999), em ensaio com morangos da cv. Sequóia tratados em pós-colheita com as mesmas concentrações de CaCl<sub>2</sub> utilizadas neste ensaio, armazenados durante 21 dias, a 4°C, também observou que o teor de cálcio total durante os dias de conservação se manteve estável.

Por outro lado, como era esperado, houve uma tendência dos frutos apresentarem aumento no teor de Ca após os tratamentos com CaCl<sub>2</sub>, nas diferentes concentrações em relação ao controlo em ambas aplicações.

**Tabela 31.** Variação média do teor de Ca total (mg de Ca g de morango liofilizado<sup>-1</sup>) nos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> em pré-colheita.

Com 1 aplicação de CaCl <sub>2</sub>			
Dias de conservação			
Tratamentos	0	3	8
Controlo	2,36 ± 0,15aB	2,72 ± 0,13abB	3,83 ± 0,30aA
1% CaCl <sub>2</sub>	3,23 ± 0,28aA	2,28 ± 0,17bB	3,13 ± 0,13aA
4% CaCl <sub>2</sub>	3,08 ± 0,35aA	3,02 ± 0,21aA	3,61 ± 0,38aA
Com 2 Aplicações CaCl <sub>2</sub>			
Dias de conservação			
Tratamentos	0	3	8
Controlo	3,98 ± 0,45bB	6,23 ± 0,17aA	6,64 ± 0,19aA
1% CaCl <sub>2</sub>	5,65 ± 1,07bA	6,41 ± 0,20aA	7,19 ± 0,26aA
4% CaCl <sub>2</sub>	8,38 ± 0,46aA	6,34 ± 0,33aA	7,06 ± 0,79aA

Médias e erros padrão médio seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Hernández-Muñoz *et al.* (2006) estudando a aplicação pós-colheita de Ca por imersão dos morangos da cv. Camarosa concluiu que a concentração de 1 % resultou em maior teor de Ca total nos frutos (2,1 mg de Ca g<sup>-1</sup> de massa seca de fruto) em comparação com o controlo e demais concentrações. Neste ensaio, para ambas as aplicações, a concentração 4 % de CaCl<sub>2</sub> foi a que resultou no maior teor de Ca total na matéria seca dos morangos.

Pelo contrário, Vance *et al.* (2017) ao avaliarem o efeito das concentrações que variaram entre 0,05 e 0,3 % de CaCl<sub>2</sub> aplicadas nos morangos até três vezes antes da colheita dos frutos, concluiu que nenhuma das concentrações ou número de aplicações de CaCl<sub>2</sub> modificou o teor de Ca nos frutos das cultivares Hood e Albion.

O cálcio é um dos principais componentes da parede celular dos tecidos das plantas e frutos. O cálcio da parede celular desempenha papel fundamental na manutenção da estabilização e integridade estrutural ao interagir com as funções de ácido carboxílico do ácido urónico nas cadeias de polissacarídeos de pectina para criar a chamada "caixa de ovos" (Vicente *et al.*, 2007).

O teor de Ca na parede celular (AIR) dos morangos nos diferentes tratamentos com CaCl<sub>2</sub> em função do tempo de conservação encontram-se na Tabela 32. O teor de Ca no AIR dos morangos não sofreu diferenças significativas em função dos dias de conservação, com exceção dos frutos tratados com uma aplicação da concentração 4 % de CaCl<sub>2</sub>. No entanto, houve diferenças significativas para o teor de Ca no AIR dos



frutos tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> (Figura 20).

**Tabela 32.** Variação média do teor de Ca (mg de Ca g de AIR<sup>-1</sup>) no AIR dos morangos cv. Portola ao longo do período de conservação tratados com 1 ou 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> em pré-colheita.

com 1 aplicação de CaCl <sub>2</sub>			
Dias de conservação			
Tratamentos	0	4	8
Controlo	12,48 ± 1,36bA	16,13 ± 3,23aA	8,25 ± 0,19aA
1% CaCl <sub>2</sub>	13,68 ± 1,68bA	10,83 ± 1,57bA	9,52 ± 2,15aA
4% CaCl <sub>2</sub>	19,28 ± 1,24aA	9,33 ± 0,23bB	10,04 ± 0,48aB
com 2 Aplicações CaCl <sub>2</sub>			
Dias de conservação			
Tratamentos	0	4	8
Controlo	8,61 ± 1,49aA	5,83 ± 2,08bA	9,81 ± 2,73bA
1% CaCl <sub>2</sub>	11,52 ± 1,67aA	17,07 ± 4,11aA	9,07 ± 1,21bA
4% CaCl <sub>2</sub>	9,84 ± 2,35aA	14,84 ± 2,38aA	17,38 ± 2,39aA

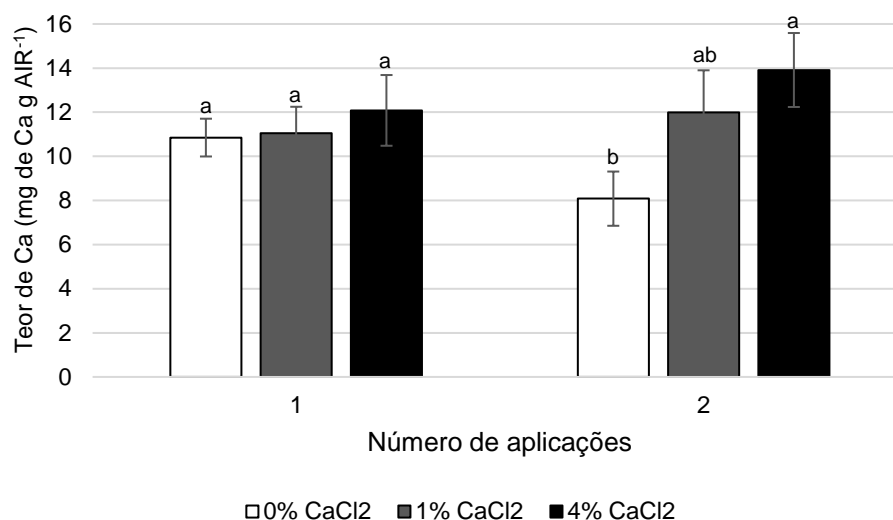
Médias e erros padrão médio seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna, diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com exceção dos resultados obtidos para os frutos que receberam 1 aplicação das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> no 4º dia de conservação, os tratamentos com 1 e 2 aplicações de 1 % e 4 % de CaCl<sub>2</sub> promoveram o aumento do teor de Ca no AIR dos frutos. Na análise de comparação de médias considerando o número de aplicações e as diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub>, houve diferenças significativas entre o teor de Ca no AIR dos frutos, em função das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> com 2 aplicações dos tratamentos (Figura 20).

Os morangos tratados com 1 aplicação, não apresentaram diferenças significativas no teor de Ca no AIR em comparação com os frutos que receberam 2 aplicações das diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> aplicadas. No entanto, nota-se uma ligeira tendência de aumento no teor de Ca no AIR dos frutos tratados com 4 % de CaCl<sub>2</sub>.

Nos morangos submetidos a 2 aplicações houveram respostas significativas do aumento do teor de Ca no AIR dos frutos tratados com as concentrações 1 % e 4 % de CaCl<sub>2</sub> em relação à concentração controlo (0 % de CaCl<sub>2</sub>), sendo a concentração 4 % de CaCl<sub>2</sub> a que promoveu o maior teor de Ca no AIR dos morangos. Belge *et al.* (2017) ao realizarem uma aplicação com as concentrações 1,5 % e 3 % de CaCl<sub>2</sub> em ameixas e armazenando-as a 0 °C por 14 dias, não obtiveram diferenças significativas no teor de Ca

no AIR destes frutos, em função da concentração de  $\text{CaCl}_2$  aplicada; no entanto, a concentração 3 % apresentou teor ligeiramente superior no AIR dos frutos em comparação com a concentração de 1,5 %.



**Figura 20.** Variação média do teor de Ca ( $\text{mg de Ca g de AIR}^{-1}$ ) no AIR dos morangos cv. Portola nas diferentes doses de  $\text{CaCl}_2$  com 1 e 2 aplicações. Médias e erros padrão seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,5$ ).

### 3.3 Deterioração dos morangos

O morango caracteriza-se por ser muito perecível e gravemente afetado por danos mecânicos e doenças, principalmente fúngicas. Frequentemente estes danos por causa mecânica ou presença de fungos só se tornam evidentes quando os frutos são colocados à temperatura ambiente, à semelhança do que acontece no consumo corrente do morango, quando são retirados das câmaras e colocados à temperatura ambiente nas prateleiras de exposição no comércio e depois em casa do consumidor.

O cloreto de cálcio tem sido utilizado com sucesso em pesquisas que visam a manutenção da qualidade dos frutos ao longo do período de conservação, redução da deterioração da epiderme e da incidência de doenças (Souza *et al.*, 1999; Verdini *et al.*, 2008; Kitemmann *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011b).

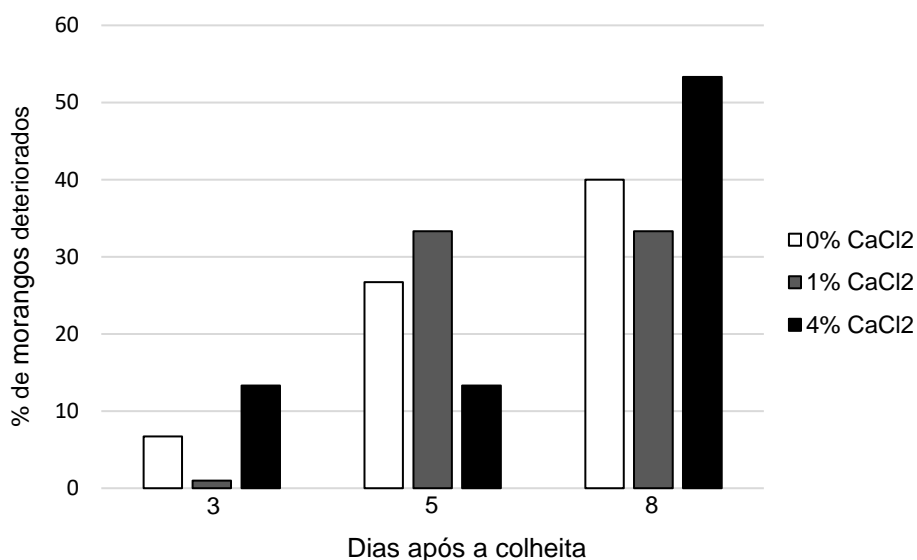
A percentagem de deterioração dos morangos que receberam 2 aplicações das diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  encontra-se na Figura 21. Nos dias em que os frutos foram avaliados, a utilização de  $\text{CaCl}_2$  nos morangos parece ter afetado a deterioração dos frutos quando comparado com o tratamento controle. A redução da deterioração dos morangos resultante da aplicação de  $\text{CaCl}_2$  é provavelmente devida ao aumento da resistência nos tecidos da epiderme dos frutos. O aumento desta resistência pode ser

devido a fatores como alterações na estrutura da parede celular ou estimulação da produção de compostos antifúngicos ou fitoalexinas (Johnson e Berrie, 2010).

Neste ensaio, apesar de no 5º dia de avaliação, a percentagem de frutos deteriorados ter sido superior para a concentração 1 % de  $\text{CaCl}_2$ , esta foi a mais efetiva, com apenas 0,98 % dos morangos deteriorados nos primeiros três dias após a colheita, que normalmente é o período em que os morangos são comercializados. Esta mesma concentração de  $\text{CaCl}_2$  apresentou uma boa eficiência no 8º dia após a colheita, com 66,7 % de morangos aparentemente saudáveis. Contudo, a concentração mais elevada, que no dia 3 tinha sido muito eficaz, proporcionou ao oitavo dia efeitos mais negativos na deterioração dos morangos.

Singh *et al.* (1993) ao estudarem o efeito da aplicação de  $\text{CaCl}_2$  em mangas, notaram que concentrações acima de 1,2 % de  $\text{CaCl}_2$  causaram queimaduras na epiderme das frutas, contribuindo para a redução do período de conservação.

Resultados muito mais positivos foram encontrados por Souza *et al.* (1999) que obtiveram morangos sem infeções visuais ou qualquer deterioração na aparência externa durante o período de conservação de 21 dias a 4 °C quando tratados com 0,5 e 1 % de  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura 21.** Percentagem (%) de morangos cv. Portola deteriorados nas concentrações 0, 1 e 4 % de  $\text{CaCl}_2$  com 2 aplicações em função dos dias após a colheita.

#### 4. Conclusões

Nas condições em que o ensaio foi realizado, os resultados obtidos para a firmeza dos frutos revelaram que não houve efeito do número de aplicações das diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  em pré-colheita no tempo de conservação dos frutos; porém, os frutos tratados com 1 aplicação mostraram-se mais firmes que os frutos tratados com 2 aplicações das diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$ .

A luminosidade dos frutos que receberam 1 aplicação das diferentes doses de  $\text{CaCl}_2$  não foi alterada pelos tratamentos; porém, foi reduzida em função dos dias de conservação.

A utilização de 2 aplicações da concentração 4 % de  $\text{CaCl}_2$  foi prejudicial para cor dos frutos, reduzindo significativamente a luminosidade e a intensidade da tonalidade dos frutos ao longo dos dias de conservação.

O número de aplicações e as diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  tiveram pouca influência nos parâmetros químicos da qualidade dos frutos, tais como os sólidos solúveis totais, a acidez titulável, o pH e a relação sólidos solúveis totais/ acidez titulável. Entretanto, a utilização de duas aplicações de concentração 4 % de  $\text{CaCl}_2$  em pré-colheita nos frutos ocasionou uma redução nos sólidos solúveis totais em função dos dias de conservação.

Em geral, houve alterações no teor de Ca total dos frutos tratados com 1 ou 2 aplicações de  $\text{CaCl}_2$  para as diferentes concentrações testadas, em função dos dias de conservação e independentemente do número de aplicações. Os frutos tratados com a concentração 4 % de  $\text{CaCl}_2$  foram os que apresentaram o maior teor de Ca total. Nas paredes celulares, a utilização de 1 e 2 aplicações das concentrações 1 e 4 % de  $\text{CaCl}_2$  nos frutos em pré-colheita promoveram o aumento do teor de Ca no AIR dos frutos. Em geral, os frutos tratados com 2 aplicações da concentração 4 % de  $\text{CaCl}_2$  apresentaram o maior teor em Ca neste tecido.

A utilização de  $\text{CaCl}_2$  tem efeito sobre a deterioração dos frutos causada pela presença de fungos ou por danos. A aplicação da concentração 1 % de  $\text{CaCl}_2$  nos frutos em pré-colheita mostrou-se muito eficaz no controlo da deterioração até o 5º dia de conservação a temperatura ambiente, o que poderá ser útil sob o ponto de vista prático; a utilização da concentração 4 % de  $\text{CaCl}_2$  parece favorecer o aparecimento de danos nos frutos.

Estes resultados tornam viável a utilização do  $\text{CaCl}_2$  para manutenção da qualidade dos frutos e proteção contra a deterioração. De modo geral, a utilização de 1 ou 2 aplicações em pré-colheita da concentração 4 % de  $\text{CaCl}_2$  é prejudicial aos frutos, sendo a utilização de 1 aplicação da concentração 1 % de  $\text{CaCl}_2$  em pré-colheita, o

tratamento indicado para a manutenção da qualidade ao longo de 8 dias de conservação dos morangos.



## Capítulo V

---





## Calibração do método rápido baseado na espectroscopia FT-NIR para avaliação do teor de K, Ca e Mg na parede celular de morangos

---

### 1. Introdução

A análise nutricional dos tecidos do morangueiro é uma prática utilizada frequentemente para o controlo da nutrição das plantas e conhecimento do teor de nutrientes nos frutos. Os resultados destas análises químicas permitem identificar distúrbios nutricionais causados por excesso ou deficiência mineral e servem como guia para programas equilibrados de fertilização. Contudo, tais análises são realizadas através de métodos destrutivos que requerem processos complexos na preparação das amostras, demorados, onerosos, que necessitam de um número considerável de horas de trabalho em laboratório para além da utilização de uma grande quantidade de reagentes químicos (Wu e Sun, 2013).

Numerosos estudos relatam a utilização da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) para analisar de forma rápida, não destrutiva, eficiente e de baixo impacto ambiental, parâmetros relacionados com a qualidade interna e externa de vários produtos alimentares (Sirisomboon *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015; Amodio *et al.*, 2017), com o teor em areia, argila, Ca, K, Mg, Fe, sódio (Na) e cobre (Cu) em solos (Cozzolino e Morón, 2003), com a determinação das concentrações de macro e micronutrientes em vinho (Cozzolino *et al.*, 2008) e com a quantificação de açúcares constituintes da parede celular em pêsegos, damascos e abóboras (Kurz *et al.*, 2010).

Os benefícios da utilização da tecnologia NIR baseia-se no facto de cada amostra possui um espectro, como uma impressão digital, que consiste num padrão único e característico. Assim, se mais de uma amostra exibem espectros similares, parte-se do suposto de que estas possuem composições químicas e físicas muito semelhantes. Em contrapartida, as diferenças entre os espectros indicam que as amostras são física e quimicamente diferentes (Workman e Shenk, 2004).

Para que a espectroscopia NIR seja utilizada rotineiramente na avaliação de qualquer parâmetro é necessário o desenvolvimento de modelos de calibração. Assim, a utilização desta técnica depende da obtenção destes modelos para prever os valores dos parâmetros qualitativos e é através destes modelos que se determina o comportamento do sistema como um todo (Xie *et al.*, 2009). Uma vez determinado o modelo de calibração é necessário que se valide a sua capacidade de previsão. Este procedimento é especialmente relevante para a verificação do nível de ajuste do modelo no momento da previsão de novas amostras (Roggo *et al.*, 2007).

A espectroscopia NIR já foi testada para ser utilizada como ferramenta para determinação dos teores da maioria dos nutrientes essenciais em numerosas espécies de plantas, geralmente usando técnicas de quimiometria para relacionar a informação espectral com o teor do nutriente em estudo. No entanto, até ao presente, não há informações na literatura sobre utilização da espectroscopia NIR para prever teores de nutrientes minerais na parede celular de frutos de morango. Desta forma, o objetivo deste ensaio foi avaliar a potencialidade da espectroscopia NIR para determinar o teor de nutrientes neste tecido isoladamente. Com este intuito, foram desenvolvidos modelos para prever o teor em K, Ca e Mg na parede celular dos frutos utilizando espectroscopia FT-NIR e métodos multivariados, com base em um conjunto de calibrações.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Obtenção, características das amostras**

As amostras da parede celular dos morangos obtidas através do resíduo insolúvel em álcool (AIR) deste ensaio foram as mesmas obtidas a partir do Ensaio 1 e 2, totalizando 47 amostras.

Nestas mesmas amostras foram realizadas as determinações dos teores em K, Ca e Mg pelo método de referência (digestão nitroperclórica) para posterior comparação com os teores ajustados pelos modelos para cada elemento. A descrição detalhada da metodologia utilizada para extração e determinação dos teores de K, Ca e Mg destes AIRs encontra-se no Material e Métodos do Ensaio I - 2.6.3 Avaliação do teor em Ca, K e Mg nos diferentes órgãos da planta (Extração e teor em Ca, K e Mg na parede celular dos morangos).

### **2.2 Aquisição dos espectros NIR**

A aquisição dos espectros FT-NIR foi realizada com um espectrómetro analisador multifuncional (MPA Multi Purpose FT-NIR Analyser, Bruker Corporation, USA), equipado com uma esfera integradora para fornecer medições de reflectância difusa. Foram realizadas nas 47 amostras de AIR dentro do intervalo de comprimento de onda de  $12500 - 3600 \text{ cm}^{-1}$  e resolução de  $16 \text{ cm}^{-1}$  e foram feitas 36 leituras por amostra.

### **2.3 Pré-tratamentos dos espectros e construção dos modelos**

As amostras foram divididas em dois conjuntos: grupo de calibração com 70 % dos espectros e o grupo de validação externa com 30 %. Os modelos de calibração

multivariada foram preliminarmente desenvolvidos com características particulares para cada parâmetro, utilizando-se diversas regiões espectrais e vários tipos de pré-tratamentos de sinais. Para a construção destes modelos, foi utilizado o método de regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR) através do *software* Opus Quant 2.0 Analysis (Bruker Coporation, USA).

Para o Ca, K e Mg foram escolhidas as regiões mais representativas do espectro para a construção do modelo de calibração. Vários pré-tratamentos foram testados sobre os espectros em bruto, no entanto, os pré-tratamentos em que se obteve os melhores modelos de calibração na região mais representativa do espectro para a construção do modelo de calibração para cada um dos elementos minerais em estudo encontram-se na Tabela 33.

**Tabela 33.** Região do espectro e pré-tratamentos utilizados para construção do modelo de calibração para o cálcio, potássio e magnésio.

	Região do espectro (cm <sup>-1</sup> )	Pré-tratamento
Cálcio	9403,9 – 4597,8	não utilizado
Potássio	7506,1 – 4242,9	1ª derivada e SNV
Magnésio	7506,1 – 4597,8	1ª derivada e SNV

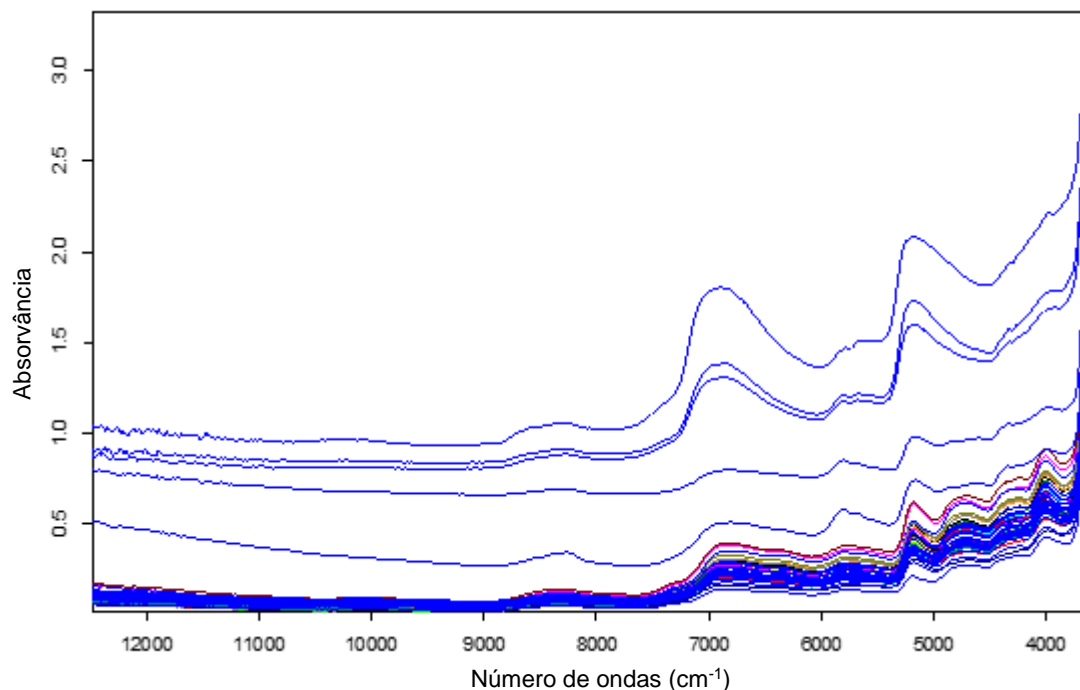
SNV – normalização

No pré-tratamento empregado para o K e Mg, a função da 1ª derivada foi realizar a compensação do aumento da linha de base e realçar a separação de sinais não totalmente sobrepostos, enquanto que a normalização foi utilizada para minimizar as interferências causadas pelas diferenças de densidade das amostras.

Após a utilização do PLSR nos espectros, recorreu-se a uma validação cruzada (*cross validation*) do tipo *Random*. Foi utilizada a validação cruzada pois esta exclui um conjunto de amostras do conjunto de calibração, onde após a construção do modelo, se prevê o valor analítico dessas amostras de forma a minimizar o erro de previsão. As exatidões dos modelos das concentrações de K, Ca e Mg foram analisadas por intermédio dos erros expressos na forma de RMSEC e RMSECV. Além disso, foram avaliados o R<sup>2</sup>, o RPD, a inclinação da reta e o coeficiente de correlação (r) dos conjuntos de calibração e validação e o BIAS. O BIAS foi somente calculado para a validação, uma vez que para a calibração pressupõem-se que este valor será zero.

### 3. Resultados e discussão

Os espectros obtidos sem qualquer pré-tratamento na região do infravermelho próximo, dentro do intervalo de comprimento de onda de 12500 – 3600  $\text{cm}^{-1}$ , para todas as amostras da parede celular dos morangos (AIR), são apresentados Figura 22.



**Figura 22.** Visão geral dos espectros FT-NIR das amostras da parede celular dos morangos (AIR) obtidas no intervalo de 12500 – 3600  $\text{cm}^{-1}$ .

Após a análise das amostras (AIR), foram usadas técnicas de quimiometria para a construção de modelos PLSR para a previsão do teor em Ca, K e Mg da parede celular dos morangos em estudo. Uma visão geral dos valores médios de referência dos teores de Ca, K e Mg determinados nas amostras da parede celular e os valores previstos pelo FT-NIR são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 34.** Valores médios de referência (VR), valores previstos pelo FT-NIR (VP) e diferença entre os VR e VP (Dif.) para os teores de cálcio, potássio e magnésio na parede celular dos morangos ( $\text{mg g}^{-1}$  de AIR).

cálcio			potássio			magnésio		
VR	VP	Dif.	VR	VP	Dif.	VR	VP	Dif.
12,21	11,83	0,38	11,68	11,45	0,23	2,22	2,42	-0,20
10,82	11,09	-0,27	10,27	11,13	-0,86	2,71	2,71	0,00
9,33	10,12	-0,79	14,05	13,98	0,07	2,75	2,29	0,47
9,52	9,27	0,25	4,35	3,97	0,38	1,67	1,50	0,17
8,64	8,79	-0,15	1,02	1,68	-0,66	1,73	2,04	-0,31
9,90	10,25	-0,35	15,93	15,09	0,84	1,96	1,97	-0,01
9,70	9,14	0,56	7,86	8,10	-0,24	2,97	2,86	0,11
9,46	9,12	0,35	5,81	6,76	-0,94	2,85	2,80	0,05
6,27	6,17	0,09	3,24	4,09	-0,85	2,34	2,42	-0,08
7,35	7,52	-0,17	9,59	8,80	0,79	3,13	3,16	-0,03

### 3.1 Obtenção dos modelos de calibração e validação

Inicialmente para a construção dos modelos de regressão multivariados para a determinação do teor de cálcio, potássio e magnésio, utilizou-se uma determinada região espectral  $12500 - 3600 \text{ cm}^{-1}$  em FT-NIR para cada um dos elementos estudados. Devido a dificuldade de atribuir uma única banda para cada elemento, procurou-se obter os modelos otimizados para o cálcio, o potássio e o magnésio individualmente.

Diferentes pré-tratamentos foram aplicados aos espectros na tentativa de obter alguma separação ou identificação de grupos específicos, ou seja, observar se as amostras da parede celular utilizadas apresentavam composições semelhantes. Dentre os pré-tratamentos testados, foram escolhidos os tratamentos que apresentaram a melhor qualidade para obtenção do modelo de calibração na região mais representativa do espectro para cada um dos elementos em estudo, como apresentado na Tabela 33.

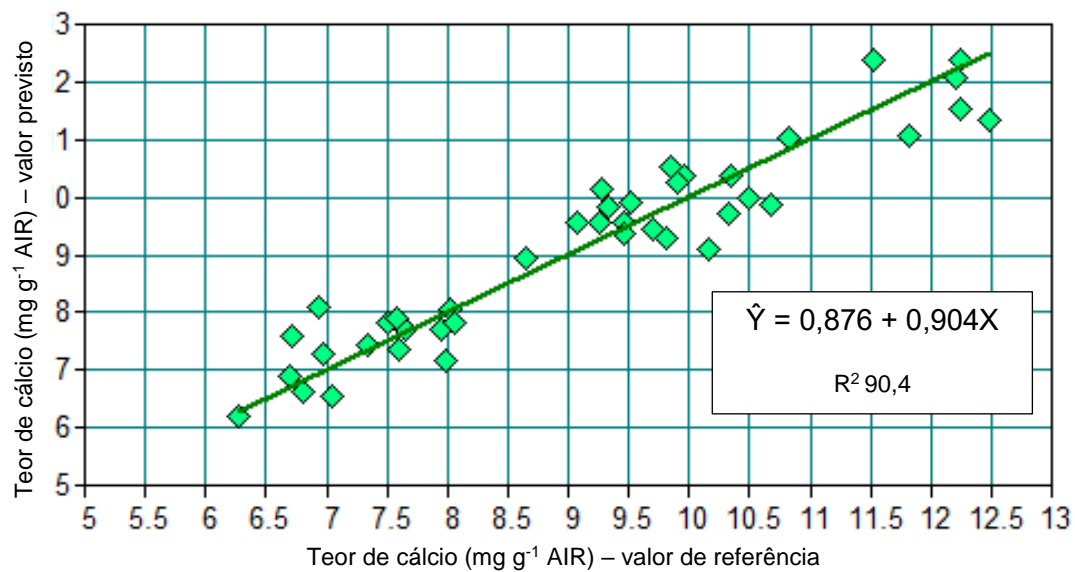
Ao avaliar a capacidade de previsão do teor em Ca, K e Mg no AIR, notou-se uma grande facilidade para obter uma boa correlação entre os valores calculados pelos modelos obtidos e os valores encontrados pelas análises químicas de referência. Na Tabela 35 são apresentados os resultados dos parâmetros utilizados para avaliar a robustez dos modelos de calibração e validação, tais como: o coeficiente de determinação da regressão ( $R^2$ ); a inclinação da reta; a raiz quadrada da soma dos erros da calibração e validação, RMSEC e RMSECV respectivamente; o desvio de predição residual (RPD) e o coeficiente de correlação ( $r$ ) para prever os teores de Ca, K e Mg nas amostras da parede celular dos morangos.

**Tabela 35.** Parâmetros estatísticos para obtenção do modelo PLSR de calibração e validação cruzada para os teores de cálcio, potássio e magnésio na parede celular dos morangos (AIR).

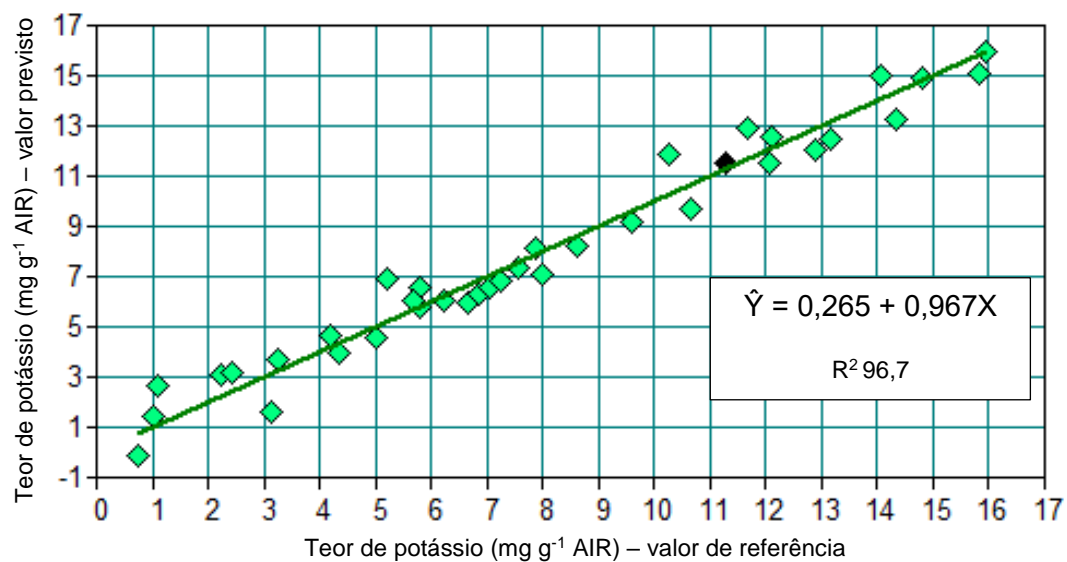
<b>Calibração</b>						
		R <sup>2</sup> (%)	Inclinação	RMSEC	RPD	r
Cálcio		90,45	0,904	0,62	3,24	0,95
Potássio		96,68	0,967	0,94	5,48	0,98
Magnésio		94,13	0,941	0,17	4,13	0,97
<b>Validação</b>						
	Bias	R <sup>2</sup> (%)	Inclinação	RMSECV	RPD	r
Cálcio	0,005	78,58	0,893	0,81	2,16	0,89
Potássio	0,254	86,09	0,916	1,62	2,71	0,93
Magnésio	0,008	85,84	0,906	0,23	2,66	0,93

O modelo de calibração que apresentou melhor ajustamento, foi o modelo para o teor de potássio presente na parede celular dos morangos (Tabela 35). No entanto, os modelos de calibração para o teor de cálcio e magnésio também apresentam alta qualidade de predição com base no valor de R<sup>2</sup>. Um valor de R<sup>2</sup> entre 0,50 e 0,65 indica que mais de 50 % da variância em Y é contabilizado pela variável X, de forma que a discriminação entre as concentrações alta e baixa podem ser feitas. Um valor para R<sup>2</sup> entre 0,66 e 0,81 indica aproximadas previsões quantitativas, enquanto que um valor de R<sup>2</sup> entre 0,82 e 0,90 revela boa previsão. Modelos de calibração com um valor acima de 0,91 para R<sup>2</sup> são considerados excelentes (Williams, 2004; Morgano, 2005).

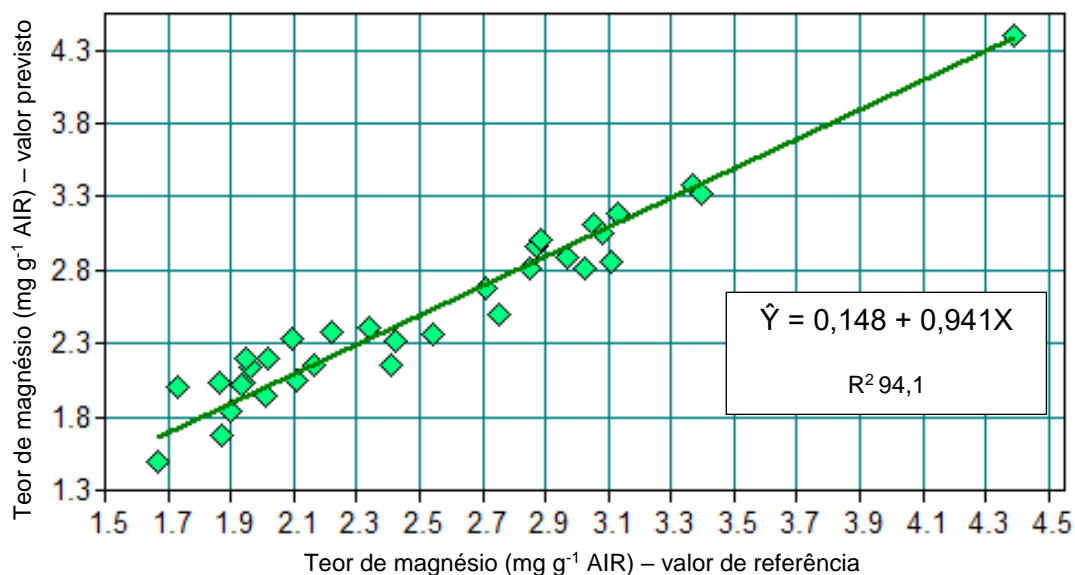
As retas e os modelos PLSR de calibração obtidos para a determinação do teor de Ca, K e Mg nas amostras da parede celular dos morangos estão apresentados na Figura 23, 24 e 25, respectivamente.



**Figura 23.** Retas de calibração obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em cálcio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR).



**Figura 24.** Retas de calibração obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em potássio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR).



**Figura 25.** Retas de calibração obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em magnésio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR).

Foram verificadas excelentes correlações entre os valores obtidos para o teor ( $\text{mg g}^{-1}$ ) em Ca, K e Mg,  $r = 0,95$ ,  $r = 0,98$  e  $r = 0,97$  %, respectivamente entre os valores da análise química de referência e os valores previstos pelo FT-NIR (Tabela 35) e não foi verificada uma sobrevalorização dos modelos de calibração obtidos para nenhum dos elementos. A sobrevalorização é uma característica avaliada com auxílio dos valores dos erros dos modelos. Esta avaliação é realizada ao comparar os valores de RMSEC com RMSECV. O RMSEC é um parâmetro que incorpora erros aleatórios e sistemáticos no modelo (Chau *et al.*, 2004). Quando o valor de RMSEC é inferior ao valor de RMSECV, significa que o modelo não apresenta sobreajuste, uma vez que no processo de validação cruzada ocorre a remoção dos pontos extremos.

O valor de RPD corresponde a proporção do desvio padrão da variável de resposta pelo RMSEC ou RMSECV, representando assim o erro médio dos valores da calibração e validação, respectivamente. Consequentemente, o RPD relaciona o desempenho da calibração com o intervalo de medidas e é frequentemente usado como um indicador de qualidade da calibração (Ward *et al.*, 2011; Williams, 2014).

De acordo com Nicolai *et al.* (2007), um RPD de 1,5 – 2 indica que o modelo possui a capacidade de discriminar repostas extremas (resposta muito baixa ou muito alta) de cada variável, enquanto um valor RPD de 2 – 2,5 indica que as previsões quantitativas são grosseiras, no entanto, são possíveis, e valores de 2,5 – 3 ou acima são indicativos de boas e excelentes precisões preditivas do modelo. No entanto, a interpretação da qualidade dos modelos de calibrações com base nos valores de RPD é feita de modos diferentes de acordo com o tipo de material em estudo (Huang *et al.*,



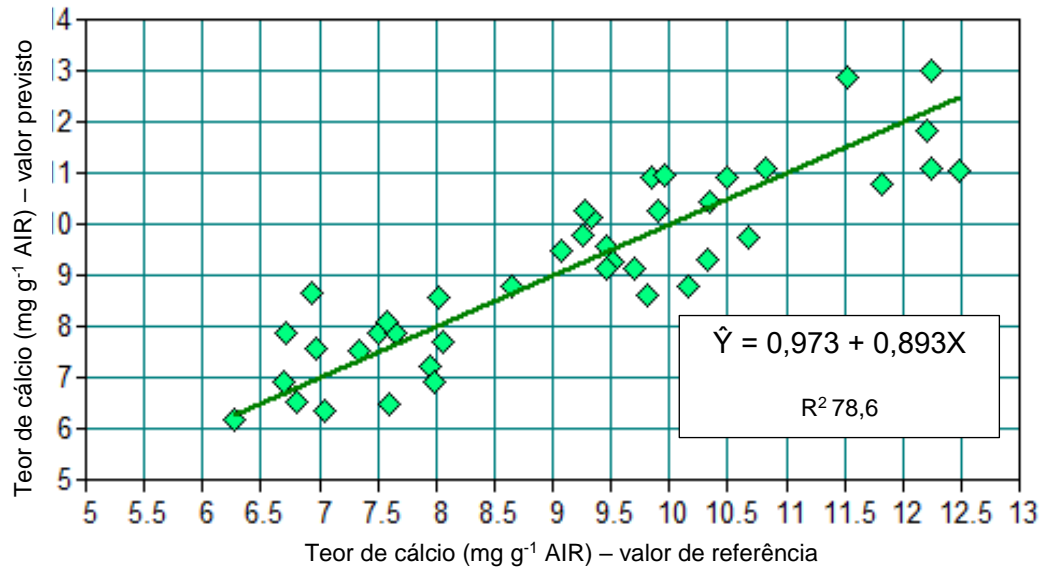
2009; Ward *et al.*, 2011). Alguns autores consideram um valor de RPD iguais ou superiores a 2 como um excelente indicador de precisão do modelo de calibração (Chang *et al.*, 2001; Dunn *et al.*, 2002). O modelo de calibração para o teor de cálcio, potássio e magnésio na parede celular dos morangos apresentaram valores de RPD acima de 3, indicando assim, para estes modelos, um excelente potencial de previsão (Tabela 35).

A validação foi realizada na intenção de demonstrar que os métodos utilizados para obter os modelos de calibração, nas condições em que foram executados, apresentam boas condições para preverem o teor de Ca, K e Mg nas amostras da parede celular dos morangos.

Quando o modelo foi aplicado para prever o teor em Ca em 30 % das amostras na etapa de validação, obteve-se um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 78,6. A Figura 25 apresenta a dispersão entre os valores determinados pela análise de referência e os valores previstos pelo modelo PLSR para a validação para o teor de Ca na parede celular dos morangos. Observa-se que os dados se apresentaram relativamente dispersos em relação a reta de regressão, com ajuste pouco adequado ao modelo que pode ser interpretado também pelo valor do  $R^2$  relativamente baixo (78,6%).

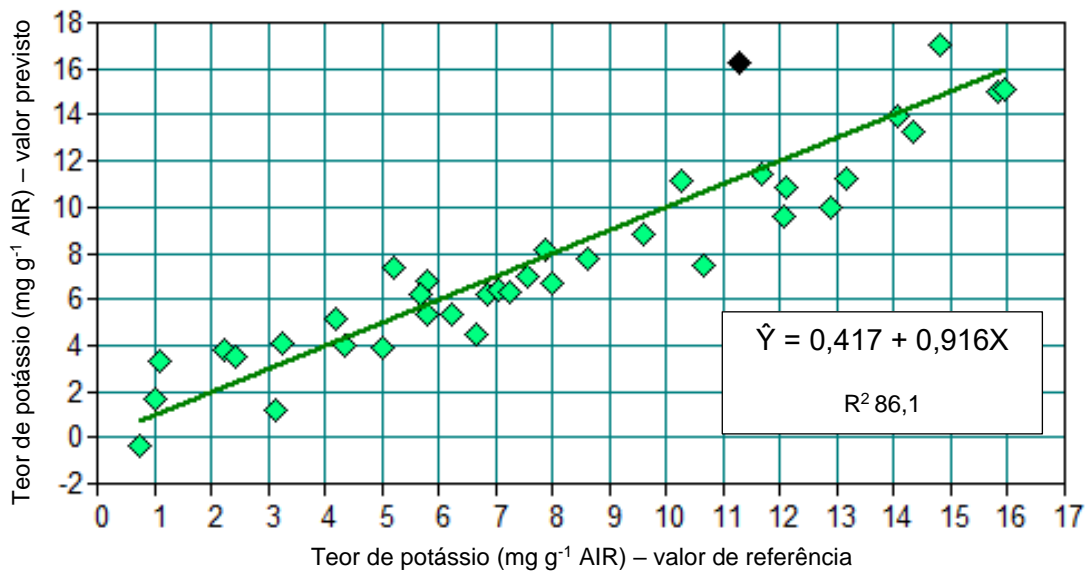
O valor do BIAS (viés) e da inclinação da reta são outros critério utilizados para avaliar o modelo de validação dos parâmetros em estudo. O BIAS indica o desvio de previsão dos valores observados e idealmente não deve exceder 0,6 e uma inclinação mínima para um modelo satisfatório deve ser 0,90 (Sánchez *et al.*, 2011).

Apesar dos valores de Bias e inclinação deste modelo estarem dentro dos intervalos ideais, 0,005 e 0,89, respetivamente, pela avaliação dos valor de RPD utilizando os níveis de RPD propostos por Nicolai *et al.* (2007), apenas uma previsão quantitativa grosseira foi conseguida no modelo PLSR obtido para a validação do teor de cálcio na parede celular dos morangos.



**Figura 26.** Retas de validação obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em cálcio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR).

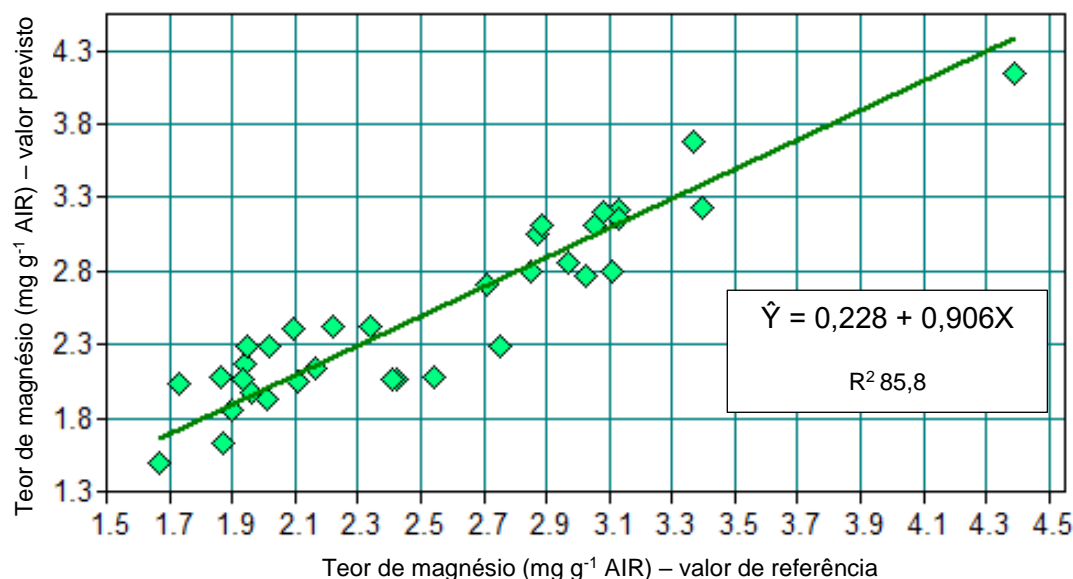
A reta obtida para a validação do teor de K no AIR dos morangos está apresentada na Figura 27.



**Figura 27.** Retas de validação obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em potássio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR).

Com base nos resultados obteve-se um modelo de previsão do teor de K na parede celular dos frutos (Tabela 35), observando-se que o modelo conseguiu explicar 86,1 % da variância presente na amostra de referência. O valor do RPD mostra que este modelo apresentou excelentes precisões preditivas, com valor igual a 2,71 e conforme apresentando na Tabela 35, a inclinação da reta foi alta (0,91) e o valor de BIAS abaixo do valor limite (0,254) encontrado na literatura (Sánchez *et al.*, 2011).

Tal como ocorreu no modelo desenvolvido para validação do teor de K na parede celular dos morangos, o modelo para validação do teor de Mg também apresentou uma excelente precisão de previsão, com RPD de 2,66 (Tabela 35) e um  $R^2$  de 85,8 %. Para além disso, o valor da inclinação da reta (0,90) e o valor de BIAS (0,008) mostraram-se como valores aceitáveis para o desenvolvimento de um bom modelo. A reta obtida para a validação do teor de Mg na parede celular dos morangos está apresentada na Figura 28.



**Figura 28.** Retas de validação obtidas pelo modelo PLSR para a previsão do teor em magnésio nas amostras da parede celular dos morangos (AIR).

Até o momento não foram encontrados na literatura trabalhos que recorrem à espectroscopia FT-NIR para prever os teores de Ca, K e Mg na parede celular de morangos. No entanto, esta técnica espectroscópica já foi utilizada para prever alguns parâmetros de qualidade interna em morangos resultando em modelos promissores com alta capacidade de predição, tal como referem Amodio *et al.* (2017). Estes autores obtiveram bons modelos de previsão do conteúdo de sólidos solúveis totais ( $R^2 = 0,85$ ; RMSEV = 0,58) e pH ( $R^2 = 0,86$ ; RMSEV = 0,09) com valores de  $R^2$  similares aos valores de  $R^2$  encontrados no presente ensaio para prever o teor de K e Mg na parede celular dos morangos.

#### 4. Conclusões

A espectroscopia FT-NIR associada ao método multivariado PLSR apresenta potencial para ser utilizada como método prático e rápido de rotina para prever os teores de Ca, K e Mg na parede celular de morangos. No entanto, os modelos obtidos para

prever K e Mg foram mais precisos que o modelo para prever Ca, com base no coeficiente de determinação da regressão ( $R^2$ ).

Correlações elevadas entre os valores de referência das análises químicas e os valores obtidos pelo FT-NIR foram obtidas para teor de Ca, K e Mg nas amostras da parede celular dos morangos obtidas através do resíduo insolúvel em álcool (AIR) e o valor de RPD foi para todos os elementos minerais em estudo, considerado adequado para o desenvolvimento de bons modelos de previsão.

Os modelos obtidos neste ensaio para o K e Mg possuem características que lhes conferem elevada qualidade de previsão, sendo recomendados para determinação do teor destes elementos na parede celular dos morangos utilizando o equipamento espectrómetro analisador multifuncional FT-NIR (MPA Multi Purpose FT-NIR Analyser, Bruker).

## **Considerações finais e Perspetivas futuras**

---



A agricultura moderna requer um manejo cada vez mais preciso dos nutrientes. A prática de uma fertilização excessiva em potássio é uma realidade comum entre os produtores de frutos, conduzindo a perdas económicas pelo excesso de fertilizante utilizado e causando efeitos secundários que podem limitar a produção, a qualidade e a conservação dos frutos produzidos. Por outro lado, sob condições de baixa disponibilidade de potássio, as plantas não podem expressar todo o seu potencial genético, manifestando por vezes, alterações morfológicas e fisiológicas que se repercutem sobre o crescimento e desenvolvimento vegetativo sobre a produção. A adubação deve ser suficientemente ajustada para proporcionar um rendimento ótimo e uma elevada qualidade dos frutos produzidos.

No sistema de produção de morangos hidropónicos, a composição da solução nutritiva é o fator que mais contribui para o desenvolvimento e produção dos morangueiros. Apesar da existência de alguns estudos sobre o assunto, ainda não está totalmente compreendido o efeito da adubação potássica sobre os aspetos gerais do morangueiro, principalmente o efeito do excesso deste elemento.

Através das informações disponíveis na literatura (revisada no Capítulo I desta tese), não restam dúvidas de que dos macro elementos minerais requeridos pelas plantas, o potássio é o mais envolvido na manutenção do estado hídrico das plantas e na melhoria das características organolépticas dos frutos em geral. Contudo, pouca informação existe sobre os efeitos do excesso de potássio na solução nutritiva dos morangueiros. Devido ao facto do potássio ser um elemento que raramente causa sintomas visuais de toxicidade nas plantas, a preocupação da maioria dos produtores é com a falta e não com o excesso deste elemento, o que leva a que surjam, por vezes, soluções nutritivas com este elemento em excesso para garantir ilusoriamente a 'qualidade dos frutos', sem ter em consideração as consequências negativas que a adubação potássica excessiva pode ocasionar na qualidade da produção em geral.

Apesar da grande variedade de formulações de soluções nutritivas disponíveis para a cultura do morangueiro (revisado no Capítulo I), nos ensaios desenvolvidos no Capítulo II, ficou claro que o manejo da concentração de potássio na solução nutritiva foi muito condicionado pelo substrato utilizado como meio de crescimento das plantas. A utilização de areia como substrato para o crescimento dos morangueiros (ensaio I do Capítulo II) foi proposta com a intenção de compreender o efeito sobre o comportamento fisiológico das plantas, das diferentes concentrações de potássio, em concentração reduzida e excessiva. A escolha da areia como substrato resultou do facto desta não possuir capacidade de troca catiónica evitando assim mascarar os efeitos da interação

do potássio, principalmente com outros catiões como o cálcio e o magnésio. No ensaio II (Capítulo II), a utilização de um substrato orgânico composto por partes iguais de perlite e fibra de coco foi proposta para avaliar esta interação do potássio com o cálcio e o magnésio em condições próximas das que se praticam no cultivo comercial de morangos em Portugal. De facto, alguns dos comportamentos apresentados pelos morangueiros foram os mesmo nos dois sistemas de cultivo e para as duas cultivares utilizadas, deixando evidente que o potássio não interfere nos índices das clorofilas das folhas e que a baixa disponibilidade de potássio dificulta o processo de abertura estomática. No entanto, inesperadamente, para os dois ensaios realizados, o potássio, em geral não alterou o estado hídrico das plantas considerando os parâmetros avaliados, o que não contraria a função deste elemento na regulação do estado hídrico das células vegetais das plantas, mas que pode não ter ocorrido devido à disponibilidade de água nunca ter sido um fator limitante nos dois ensaios realizados.

Os resultados obtidos nos ensaios apresentados no Capítulo II forneceram informações para a implementação de estudos posteriores e atender a demanda de produtores, principalmente dos que cultivam morangos em sistema hidropónico.

Numa tentativa de compreender os mecanismos envolvidos no estabelecimento da homeostase iónica em condições de *stress* associadas ao défice ou ao excesso de potássio na solução nutritiva a que as plantas foram submetidas, e tendo por base o conhecimento de que as células tendem ao estabelecimento de uma razão adequada dos níveis K:Ca, foi necessário avaliar, numa primeira abordagem, o envolvimento dos genes que codificam proteínas que asseguram o transporte de cálcio na célula. No ensaio apresentado no Capítulo III, seguiu-se uma abordagem ao nível do transcrito (quantificação da expressão dos genes), tendo sido possível confirmar o envolvimento dos genes responsáveis pelo transporte de cálcio na célula perante uma condição de deficit ou excesso de potássio. No entanto, é sabido que nem sempre existe uma relação direta entre o nível de transcrito e o nível de proteína. Mecanismos de regulação pós-transcrição, como os miRNAs, o *splicing* alternativo ou a poli-adenilação alternativa são exemplos de mecanismos que podem levar ao silenciamento de genes após transcrição. Desta forma, tendo em conta os resultados obtidos no âmbito do Capítulo III, seria de interesse considerar alguns pontos, já referidos no ensaio e aprofundar este estudo. Considerar analisar a parte vegetativa (folhas) e os diferentes tecidos do fruto (epiderme e polpa) ao longo do período de desenvolvimento e maturação dos morangos seriam fatores que certamente ajudariam a entender os mecanismos que a planta utiliza para restabelecer a homeostasia iónica.

Os resultados apresentados no Capítulo III permitem validar a hipótese inicialmente apresentada e assim abrir uma porta para estudos subsequentes



considerando, não apenas genes que codificam enzimas envolvidas no transporte de cálcio na célula, mas também genes que codificam enzimas envolvidas nas vias de sinalização, percepção e transdução do sinal associado ao stress por potássio. Para além do estudo ao nível do transcrito por PCR quantitativo em *Real-time*, seria de interesse considerar a validação desses resultados ao nível da proteína. Uma das técnicas que poderia ser utilizada neste âmbito seria o *Western-blot*, selecionando os genes de maior interesse e considerando a disponibilidade de anticorpo comercial.

Além da otimização da concentração de potássio fornecido às plantas, foi estudada uma técnica para promover a manutenção da qualidade e conservação dos frutos através da aplicação de cálcio nos frutos em pré-colheita, técnica esta que se mostra promissora já que melhorou a conservação pós-colheita sem alterar o sabor, a cor e o aroma dos frutos.

São escassos os estudos sobre a aplicação deste tipo de técnica em pré-colheita nos morangos. Não há informação disponível na literatura que afirme que o cálcio aplicado nos frutos seja absorvido pelo tecido vegetal e que se deposite na lamela média das células. Contudo, sabe-se que fixação do cálcio ao nível das paredes celulares contribui para uma maior estabilidade deste tecido e desta forma para a melhoria da qualidade e conservação dos morangos. Através do ensaio realizado e apresentado no Capítulo IV, foi possível mostrar que as aplicações de cloreto de cálcio em pré-colheita nos morangos tiveram influencia na deterioração dos morangos e, embora de forma pouco consistente, melhorou a manutenção da qualidade ao longo dos dias de conservação. No entanto, não ficou comprovado de que o cálcio aplicado em pré-colheita conseguisse atravessar a epiderme dos morangos. Assim, trabalhos futuros devem ser realizados a fim de testar esta hipótese, quer a nível bioquímico quer a nível molecular, bem como aprofundar os estudos envolvendo a avaliação dos efeitos da utilização do cloreto de cálcio nos frutos em pré-colheita sobre a parede celular dos morangos, através da quantificação dos açúcares, extração e quantificação das pectinas das paredes celulares dos frutos.

O desenvolvimento de métodos que possam ser empregues de forma simples e rápida em alternativa às digestões ácidas convencionas para determinação do teor de nutrientes na parede celular de morangos, pelo nosso conhecimento, é algo que não foi ainda divulgado e foi objetivo do Capítulo V desta tese. O método desenvolveu-se e foi aplicado à parede celular, devido ao facto deste ser o tecido mais utilizado para avaliar bioquimicamente a qualidade dos frutos. A criação de modelos de regressão baseou-se na utilização da espectroscopia FT-NIR associada ao método multivariado PLSR e provou ser eficiente para ser utilizado de forma prática na rotina para prever os teores de potássio e magnésio na parede celular de morangos com elevada precisão.

Tendo como base os resultados obtidos no ensaio do Capítulo V, estudos futuros devem ser desenvolvidos para a obtenção de modelos mais precisos para que se consiga prever o teor do cálcio na parede celular com elevada exatidão. Seria também altamente desejável, o desenvolvimento de modelos para determinação do teor de nutrientes na massa seca do fruto, até ao momento ainda não realizados.

## **Referências bibliográficas**

---



- Aaby, Kjersti; Sebastian Mazur; Arnfinn Nes; Grete Skrede. 2012. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry* 132 (1):86-97.
- Akhtar, Attiq; Nadeem A Abbasi; Azhar Hussain. 2010. Effect of calcium chloride treatments on quality characteristics of loquat fruit during storage. *Pak. J. Bot* 42 (1):181-188.
- Allen, Gethyn J; Sarah P Chu; Carrie L Harrington; Karin Schumacher; Thomas Hoffmann; Yat Y Tang; Erwin Grill; Julian I Schroeder. 2001. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411 (6841):1053-1057.
- Amodio, Maria L; Francesco Ceglie; Muhammad MA Chaudhry; Francesca Piazzolla; Giancarlo Colelli. 2017. Potential of NIR spectroscopy for predicting internal quality and discriminating among strawberry fruits from different production systems. *Postharvest Biology and Technology* 125:112-121.
- Amtmann, Anna; Stephanie Troufflard; Patrick Armengaud. 2008. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum* 133 (4):682-691.
- Andriolo, Jerônimo L; Djeimi I Jänisch; Odair J Schmitt; Miriane D Picio; Francieli L Cardoso; Lígia Erpen. 2010. Doses de potássio e cálcio no crescimento da planta, na produção e na qualidade de frutas do morangueiro em cultivo sem solo. *Ciência Rural* 40:237-242.
- Andriolo, Jerônimo L; Djeimi I Jänisch; Odair J Schmitt; Marcos AB Vaz; Francieli L Cardoso; Lígia Erpen. 2009. Nutrient solution concentration on plant growth, fruit yield and quality of strawberry crop. *Ciência Rural* 39 (3):684-690.
- Antunes, Marina C; Francine L Cuquel; Maria AC Zawadneak; Átila F Mogor; Juliano TV Resende. 2014. Postharvest quality of strawberry produced during two consecutive seasons. *Horticultura Brasileira* 32:168-173.
- Ariza, María T; Patricia Reboredo-Rodríguez; Luca Mazzoni; Tamara Y Forbes-Hernández; Francesca Giampieri; Sadia Afrin; Massimiliano Gasparrini; Carmen Soria; Elsa Martínez-Ferri; Maurizio Battino. 2016. Strawberry achenes are an important source of bioactive compounds for human health. *International Journal of Molecular Sciences* 17 (7):1103.
- Ariza, Maria T; Carmen Soria; Elsa Martínez-Ferri. 2015. Developmental stages of cultivated strawberry flowers in relation to chilling sensitivity. *AoB PLANTS* 7:plv012-plv012.
- Asao, Toshiki; Md Asaduzzaman; Md Fuad Mondal; Mayumi Tokura; Fumihiko Adachi; Makoto Ueno; Mikiko Kawaguchi; Shozo Yano; Takuya Ban. 2013. Impact of reduced potassium nitrate concentrations in nutrient solution on the growth, yield and fruit quality of melon in hydroponics. *Scientia Horticulturae* 164:221-231.
- Ashley, MK; Murray Grant; A Grabov. 2005. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *Journal of experimental botany* 57 (2):425-436.

- Barbin, Douglas F; Gamal EIMasry; Da-Wen Sun; Paul Allen. 2012. Predicting quality and sensory attributes of pork using near-infrared hyperspectral imaging. *Analytica Chimica Acta* 719:30-42.
- Basson, C E; JH Groenewald; J Kossmann; C Cronjé; R Bauer. 2010. Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. *Food Chemistry* 121 (4):1156-1162.
- Basu, Arpita; Michael Rhone; Timothy J Lyons. 2010. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews* 68 (3):168-177.
- Belge, Burcu; Luis F Goulao; Eva Comabella; Jordi Graell; Isabel Lara. 2017. Refrigerated storage and calcium dips of ripe 'Celeste'sweet cherry fruit: Combined effects on cell wall metabolism. *Scientia Horticulturae* 219:182-190.
- Bhat, Rajeev; Rainer Stamminger. 2016. Impact of combination treatments of modified atmosphere packaging and refrigeration on the status of antioxidants in highly perishable strawberries. *Journal of Food Process Engineering* 39 (2):121-131.
- Boyer, John S. 2009. Evans Review: Cell wall biosynthesis and the molecular mechanism of plant enlargement. *Functional Plant Biology* 36 (5):383-394.
- Briano, R, C Peano, and NR Giuggioli. 2017. The effects of the "green passive MAP" on the evolution of the gaseous and quality parameters in strawberries. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 29 (3):198.
- Britto, Dev T., and Herbert J. Kronzucker. 2008. Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiologia Plantarum* 133 (4):637-650.
- Brummell, David A; Mark H Harpster. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47 (1):311-339.
- Bullock, D G; D S Anderson. 1998. Evaluation of the Minolta SPAD-502 chlorophyll meter for nitrogen management in corn. *Journal of Plant Nutrition* 21 (4):741-755.
- Burger, James; Paul Geladi. 2007. Spectral pre-treatments of hyperspectral near infrared images: analysis of diffuse reflectance scattering. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 15 (1):29-37.
- Cadet, Émilie; Guy Samson. 2011. Detection and discrimination of nutrient deficiencies in sunflower by blue-green and chlorophyll-a fluorescence imaging. *Journal of Plant Nutrition* 34 (14):2114-2126.
- Cakmak, Ismail. 2005. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168 (4):521-530.
- Campbell, C. 2000. Reference sufficiency ranges for plant analysis in the southern region of the United States.
- Cardeñosa, Vanessa; Evangelina Medrano; Pilar Lorenzo; Maria C Sánchez-Guerrero; Francisco Cuevas; Inmaculada Pradas; José M Moreno-Rojas. 2015. Effects of salinity and nitrogen supply on the quality and health-related compounds of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* cv. Primoris). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95 (14):2924-2930.

- Carpita, Nicholas C; David M Gibeaut. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3 (1):1-30.
- Casierra-Posada, Fánor; Jaime E Peña-Olmos. 2015. Modificaciones fotomorfogénicas inducidas por la calidad de la luz en plantas cultivadas. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 39:84-92.
- Cecatto, Ana P; Eunice O Calvete; Alexandre A Nienow; Rosiani C da Costa; Heloísa F C Mendonça; Aislam C Pazzinato. 2013. Culture systems in the production and quality of strawberry cultivars. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35:471-478.
- Chang, Cheng-Wen; David A Laird; Maurice J Mausbach; Charles R Hurburgh. 2001. Near-infrared reflectance spectroscopy–principal components regression analyses of soil properties. *Soil Science Society of America Journal* 65 (2):480-490.
- Chau, Foo-Tim; Yi-Zeng Liang; Junbin Gao; Xue-Guang Shao. 2004. *Chemometrics: from basics to wavelet transform*. Vol. 234: John Wiley & Sons.
- Chen, Lei; Hai-ying Zhong; Jian-fei Kuang; Jian-guo Li; Wang-jin Lu; Jian-ye Chen. 2011a. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta* 234 (2):377.
- Chen, Fusheng; Hui Liu; Hongshun Yang; Shaojuan Lai; Xiaoli Cheng; Ying Xin; Bao Yang; Hongjiang Hou; Yongzhi Yao; Shaobing Zhang; Guanhao Bu; Yun Deng. 2011b. Quality attributes and cell wall properties of strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.) under calcium chloride treatment. *Food Chemistry* 126 (2):450-459.
- Chitarra, MI; AB Chitarra. 2005. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. revisada e ampliada. *Lavras: Universidade Federal de Lavras* 785.
- Choi, Hyo G; Byoung Y Moon; Nam J Kang. 2016. Correlation between strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) productivity and photosynthesis-related parameters under various growth conditions. *Frontiers in Plant Science* 7 (1607).
- Coates, J. 1999. A Review of current and new technology: Used in instrumentation for Industrial vibrational spectroscopy. *Spectroscopy* 14 (10):20-34.
- Coimbra, Manuel A, Ivonne Delgadillo, Keith W Waldron, and Robert R Selvendran. 1996. Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp. In *Plant cell wall analysis*, 19-44: Springer.
- Cordenunsi, B R; J R O do Nascimento; F M Lajolo. 2003. Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. *Food Chemistry* 83 (2):167-173.
- Cozzolino, D; M J Kwiatkowski; R G Damberg; W U Cynkar; L J Janik; G Skouroumounis; M Gishen. 2008. Analysis of elements in wine using near infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Talanta* 74 (4):711-716.

- Cozzolino, D; A Morón. 2003. The potential of near-infrared reflectance spectroscopy to analyse soil chemical and physical characteristics. *The Journal of Agricultural Science* 140 (1):65-71.
- Cybulska, Justyna; Artur Zdunek; Krystyna Konstankiewicz. 2011. Calcium effect on mechanical properties of model cell walls and apple tissue. *Journal of Food Engineering* 102 (3):217-223.
- Darrow, George M. 1966. The strawberry. History, breeding and physiology. *The strawberry. History, breeding and physiology*.
- Davies, Peter. 2013. *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Springer Science & Business Media.
- De Freitas, Sergio T; Cassandro V T do Amarante; John M Labavitch; Elizabeth J Mitcham. 2010. Cellular approach to understand bitter pit development in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 57 (1):6-13.
- De Freitas, Sergio Tonetto, Cai-Zhong Jiang; Elizabeth Jeanne Mitcham. 2012. Mechanisms Involved in Calcium Deficiency Development in Tomato Fruit in Response to Gibberellins. *Journal of Plant Growth Regulation* 31 (2):221-234.
- De Freitas, Sergio T; Cassandro V T do Amarante; Abhaya M Dandekar; Elizabeth J Mitcham. 2013. Shading affects flesh calcium uptake and concentration, bitter pit incidence and other fruit traits in "Greensleeves" apple. *Scientia Horticulturae* 161:266-272.
- De Freitas, Sergio T; Andrew J McElrone; Kenneth A Shackel; Elizabeth J Mitcham. 2014. Calcium partitioning and allocation and blossom-end rot development in tomato plants in response to whole-plant and fruit-specific abscisic acid treatments. *Journal of experimental botany* 65 (1):235-247.
- Dehghanipoodeh, Safoora; Cyrus Ghobadi; Baharam Baninasab; Mahdi Gheysari; Siamak S Bidabadi. 2016. Effects of potassium silicate and nanosilica on quantitative and qualitative characteristics of a commercial strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. 'camarosa'). *Journal of Plant Nutrition* 39 (4):502-507.
- Demidchik, Vadim; Frans J M Maathuis. 2007. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* 175 (3):387-404.
- Diel, Maria I; Marcos V M Pinheiro; Carine Cocco; Daniele C Fontana; Bráulio O Caron; Gizelli M de Paula; Matheus M Pretto; Leonardo A Thiesen; Denise Schmidt. 2017. Phyllochron and phenology of strawberry cultivars from different origins cultivated in organic substrates. *Scientia Horticulturae* 220:226-232.
- Dodd, Antony N; Jörg Kudla; Dale Sanders. 2010. The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology* 61:593-620.
- Døving, Aksel; Finn Måge; Sigbjørn Vestheim. 2005. Methods for Testing Strawberry Fruit Firmness. *Small Fruits Review* 4 (2):11-34.
- Dunn, B W; G D Batten; H G Beecher; S. Ciavarella. 2002. The potential of near-infrared reflectance spectroscopy for soil analysis: a case study from the Riverine Plain



- of south-eastern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 42 (5):607-614.
- Ebrahimi, Razieh; Mohamad K Souri; Fatemeh Ebrahimi; Mostafa Ahmadizadeh. 2012. Growth and yield of strawberries under different potassium concentrations of hydroponic system in three substrates. *World Applied Sciences Journal* 16 (10):1380-1386.
- Egilla, Jonathan N; Fred T Davies; Malcolm C Drew. 2001. Effect of potassium on drought resistance of *Hibiscus rosa-sinensis* cv. Leprechaun: plant growth, leaf macro-and micronutrient content and root longevity. *Plant and Soil* 229 (2):213-224.
- El-Jendoubi, Hamdi; Juan C Melgar; Ana Álvarez-Fernández; Manuel Sanz; Anunciación Abadía; Javier Abadía. 2011. Setting good practices to assess the efficiency of iron fertilizers. *Plant Physiology and Biochemistry* 49 (5):483-488.
- Epstein, E; A J Bloom. 2006. Nutrição mineral de plantas, princípios e perspectivas. 2ª. Ed. Londrina, Editora Planta. 403p.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Corporate Document Repository. 2004. Manual for the preparation and sale of fruits and vegetables - From field to market. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/008/y4893e/y4893e4808.htm>.
- FAOSTAT. 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Ferrarini, H. 2004. Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada, Dissertação de Mestrado, DQ-UFPR.
- Forney, Charles F; Willy Kalt; Michael A Jordan. 2000. The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity, and storage. *Hortscience* 35 (6):1022-1026.
- Franceschi, Vincent R; Paul A Nakata. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology* 56 (1):41-71.
- Fry, S C. 2001. *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*: Blackburn Press.
- Galetto, Carolina D; Roxana A Verdini; Susana E Zorrilla; Amelia C Rubiolo. 2010. Freezing of strawberries by immersion in CaCl<sub>2</sub> solutions. *Food Chemistry* 123 (2):243-248.
- Galmés, Jeroni; Jaume Flexas; Robert Savé; Hipólito Medrano. 2007. Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. *Plant and Soil* 290 (1):139-155.
- Galvão, A Gonçalves; Luciane V Resende; Renato M Guimaraes; Andrew K L Ferraz; Rafael G F Morales; Josué C Marodin; Hugo C R M Catão. 2014. Overcoming strawberry achene dormancy for improved seedling production in breeding programs. *Idesia (Arica)* 32:57-62.

- Gaxiola, Roberto A, Michael G Palmgren; Karin Schumacher. 2007. Plant proton pumps. *FEBS Letters* 581 (12):2204-2214.
- Giampieri, Francesca; Sara Tulipani; José M Alvarez-Suarez; José L Quiles; Bruno Mezzetti; Maurizio Battino. 2012. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 28 (1):9-19.
- Gilliam, Matthew; Asmini Athman; Stephen D Tyerman; Simon J Conn. 2011. Cell-specific compartmentation of mineral nutrients is an essential mechanism for optimal plant productivity— another role for TPC1? *Plant Signaling & Behavior* 6 (11):1656-1661.
- Giménez, Gustavo; Jerônimo L Andriolo; Rodrigo Godoi. 2008. Cultivo sem solo do morangueiro. *Ciência Rural* 38:273-279.
- Giuggioli, Nicoli R; Vincenzo Girgenti; Rossella Briano; Cristiana Peano. 2017. Sustainable supply-chain: evolution of the quality characteristics of strawberries stored in green film packaging. *CyTA-Journal of Food* 15 (2):211-219.
- Glenn, Gregory M; B W Poovaiah. 1990. Calcium-mediated postharvest changes in texture and cell wall structure and composition in 'Golden Delicious' apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115 (6):962-968.
- Grant, Olga M; Abigail W Johnson; Michael J Davies; Celia M James; David W Simpson. 2010. Physiological and morphological diversity of cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) in response to water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 68 (3):264-272.
- Greenwood, D J; D A Stone. 1998. Prediction and measurement of the decline in the critical-K, the maximum-K and total cation plant concentrations during the growth of field vegetable crops. *Annals of Botany* 82 (6):871-881.
- Hancock, J F; T M Sjulín; G A Lobos. 2008. Strawberries. In *Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics*, ed. J. F. Hancock, 393-437. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Hanson, Eric J; Jane L Beggs; Randolph M Beaudry. 1993. Applying calcium chloride postharvest to improve highbush blueberry firmness. *Hortscience* 28 (10):1033-1034.
- Heng K Tai; Laurence D Melton. 2002. Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology* 26 (1):23-33.
- Hennion, B; D Veschambre. 1997. La fraise: maîtrise de la production. *Paris: CTIFL*:299.
- Hepler, Peter K; Lawrence J Winship. 2010. Calcium at the cell wall-cytoplasm interface. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (2):147-160.
- Hernández-Muñoz, Pilar; Eva Almenar; María J Ocio; Rafael Gavara. 2006. Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology* 39 (3):247-253.
- Hernández-Muñoz, Pilar; Eva Almenar; Valeria Del Valle; Dinoraz Velez; Rafael Gavara. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on

- strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry* 110 (2):428-435.
- Hikosaka, K; K Ishikawa; A Borjigidai; O Muller; Y Onoda. 2006. Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *Journal of experimental botany* 57 (2):291-302.
- Hirschi, Kendal. 2001. Vacuolar H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> transport: who's directing the traffic? *Trends in plant science* 6 (3):100-104.
- Hirschi, Kendal D. 1999. Expression of Arabidopsis *CAX1* in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *The Plant Cell* 11 (11):2113-2122.
- Hocking, Bradleigh; Stephen D Tyerman; Rachel A Burton; Matthew Gilliam. 2016. Fruit calcium: transport and physiology. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Hodge, Angela. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* 162 (1):9-24.
- Hornedo-Ortega, Ruth; M A Álvarez-Fernández; Ana B Cerezo; Ana M Troncoso; M C García-Parrilla. 2016. Influence of storage conditions on the anthocyanin profile and colour of an innovative beverage elaborated by gluconic fermentation of strawberry. *Journal of Functional Foods* 23:198-209.
- Huang, Caijin; Lujia Han; Zengling Yang; Xian Liu. 2009. Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy to predict minerals in straw. *Fuel* 88 (1):163-168.
- Hummer, Kim E; James Hancock. 2009. Strawberry Genomics: Botanical, History, Cultivation, Traditional Breeding, and New Technologies. In *Genetics and Genomics of Rosaceae*, eds. K. M. Folta and S. E. Gardiner, 413-435. New York, NY: Springer New York.
- Hunsche, Maurício; Auri Brackmann; Paulo Roberto Ernani. 2003. Effect of potassium fertilization on the postharvest quality of 'Fuji' apples. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 38 (4):489-496.
- Huntley, A L. 2009. The health benefits of berry flavonoids for menopausal women: Cardiovascular disease, cancer and cognition. *Maturitas* 63 (4):297-301.
- Instituto Nacional de Estatística - Statistic Portugal. 2016. *Estatísticas agrícolas 2015*. ed. 2016. Instituto Nacional de Estatística , I.P.
- Jalali, Ali; Sadegh Seiedlou; Manfred Linke; Pramod Mahajan. 2017. A comprehensive simulation program for modified atmosphere and humidity packaging (MAHP) of fresh fruits and vegetables. *Journal of Food Engineering* 206:88-97.
- Jin, Song Heng; Jian Q Huang; Xue Q Li; Bing S Zheng; Jia S Wu; Zheng J Wang; Gen H Liu; Miao Chen. 2011. Effects of potassium supply on limitations of photosynthesis by mesophyll diffusion conductance in *Carya cathayensis*. *Tree Physiology* 31 (10):1142-1151.
- Johnson, Anna L; Rajanikanth Govindarajulu; Tia-Lynn Ashman. 2014. Bioclimatic evaluation of geographical range in *Fragaria* (Rosaceae): consequences of

- variation in breeding system, ploidy and species age. *Botanical Journal of the Linnean Society* 176 (1):99-114.
- Johnson, David S; Angela M Berrie. 2010. A review of the effect of calcium on fruit quality and susceptibility to rotting and on fungal growth and development.
- Jones Jr, J Benton. 2016. *Hydroponics: a practical guide for the soilless grower*. CRC press.
- Jordan-Meille, Lionel; Sylvain Pellerin. 2004. Leaf area establishment of a maize (*Zea mays* L.) field crop under potassium deficiency. *Plant and Soil* 265 (1-2):75-92.
- Jun, Hajoon; Heejin Jung; Katsu Imai. 2017. Gas exchange characteristics of a leading cultivar of Korean strawberry (*Fragaria xananassa*, 'Sulhyang'). *Scientia Horticulturae* 221:10-15.
- Karlıdag, Huseyin; Ertan Yildirim; Metin Turan. 2009. Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry. *Scientia Agricola* 66 (2):180-187.
- Khalifa, Ibrahim; Hassan Barakat; Hamdy A El-Mansy; Soliman A Soliman. 2016a. Enhancing the keeping quality of fresh strawberry using chitosan-incorporated olive processing wastes. *Food Bioscience* 13:69-75.
- Khalifa, Ibrahim; Hassan Barakat; Hamdy A El-Mansy; Soliman A Soliman. 2016b. Effect of chitosan–olive oil processing residues coatings on keeping quality of cold-storage strawberry (*Fragaria ananassa*. Var. Festival). *Journal of Food Quality* 39 (5):504-515.
- Khayyat, M; E Tafazoli; S Eshghi; M Rahemi; S Rajaei. 2007. Salinity, supplementary calcium and potassium effects on fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.).
- Kirkham, Mary Beth. 2014. *Principles of soil and plant water relations*: Academic Press.
- Kittermann, D; D A Neuwald; J Streif. 2009. Influence of calcium on fruit firmness and cell wall degrading enzyme activity in 'Elstar' apples during storage. Paper read at VI International Postharvest Symposium 877.
- Koushesh Saba; M K Arzani; M Barzegar. 2016. Impact of postharvest calcium treatments on storage life, biochemical attributes and chilling injury of apricot. *Journal of Agricultural Science and Technology* 18 (5):1355-1366.
- Krause, G H; E Weis. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Biology* 42 (1):313-349.
- Krebs, Melanie, Diana Beyhl, Esther Görlich, Khaled AS Al-Rasheid, Irene Marten, York-Dieter Stierhof, Rainer Hedrich; Karin Schumacher. 2010. Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (7):3251-3256.
- Kudla, Jörg; Oliver Batistič; Kenji Hashimoto. 2010. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell* 22 (3):541-563.

- Kurz, Christina; Martin Leitenberger; Reinhold Carle; Andreas Schieber. 2010. Evaluation of fruit authenticity and determination of the fruit content of fruit products using FT-NIR spectroscopy of cell wall components. *Food Chemistry* 119 (2):806-812.
- Langer, Katharina; Victor Levchenko; Jörg Fromm; Dietmar Geiger; Ralf Steinmeyer; Silke Lautner; Peter Ache; Rainer Hedrich. 2004. The poplar K<sup>+</sup> channel KPT1 is associated with K<sup>+</sup> uptake during stomatal opening and bud development. *The Plant Journal* 37 (6):828-838.
- Laohavisit, Anuphon; Zhonglin Shang; Lourdes Rubio; Tracey A Cuin; Anne-Aliénor Véry; Aihua Wang; Jennifer C Mortimer; Neil Macpherson; Katy M Coxon; Nicholas H Battey. 2012. *Arabidopsis* annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-and K<sup>+</sup>-permeable conductance in root cells. *The Plant Cell* 24 (4):1522-1533.
- Lara, I; P Garcia; M Vendrell. 2004. Modifications in cell wall composition after cold storage of calcium-treated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 34 (3):331-339.
- Lebaudy, Anne, Anne-Aliénor Véry; Hervé Sentenac. 2007. K<sup>+</sup> channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters* 581 (12):2357-2366.
- Leigh, R A; R G W Jones. 1984. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist* 97 (1):1-13.
- Leigh, Roger A. 2001. Potassium homeostasis and membrane transport. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164 (2):193-198.
- Li, Legong; Beom-Gi Kim; Yong H Cheong; Girdhar K Pandey; Sheng Luan. 2006. A Ca<sup>2+</sup> signaling pathway regulates a K<sup>+</sup> channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (33):12625-12630.
- Lieten, P. 2006. Effect of K:CA:MG ratio on performance of 'Elsanta' strawberries grown on peat.
- Lin, Duo; Danfeng Huang; Shiping Wang. 2004. Effects of potassium levels on fruit quality of muskmelon in soilless medium culture. *Scientia Horticulturae* 102 (1):53-60.
- Lin, F; Z. Chen; K Wang; J Deng; H Xu. 2009. Determination of nitrogen in rice leaf based on FTIR spectra and siPLS-GAPLS algorithm. *Journal of Infrared and Millimeter Waves* 28: 277–280.
- Lindhauer, M G. 1985. Influence of K nutrition and drought on water relations and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 148 (6):654-669.
- Lisar, Seyed Y S; Rouhollah Motafakkerzad; Mosharraf M Hossain; Ismail M M Rahman. 2012. Water stress in plants: causes, effects and responses. In *Water stress: InTech*.

- Liston, Aaron; Richard Cronn; Tia-Lynn Ashman. 2014. *Fragaria*: a genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American journal of botany* 101 (10):1686-1699.
- Liu, Li; Mei-Ling Ji; Min Chen; Ming-yue Sun; Xi-ling Fu; Ling Li; Dong-Sheng Gao; Cui-Ying Zhu. 2016. The flavor and nutritional characteristic of four strawberry varieties cultured in soilless system. *Food science & nutrition* 4 (6):858-868.
- Lodder, Robert A. 2002. Handbook of near-infrared analysis, revised and expanded. Practical spectroscopy series. v. 27 Edited by DA Burns (NIR Resources) and EW Ciurczak (Purdue Pharma LP). Dekker: New York. 2001. 814 pp. ACS Publications.
- Lodish, Harvey; Arnold Berk; S Lawrence Zipursky; Paul Matsudaira; David Baltimore; James Darnell. 2000. Molecular cell biology 4th edition. *National Center for Biotechnology Information's Bookshelf*.
- López, M. A. 2016. Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging for non-destructive quality inspection of potatoes, Department of Projects and Rural Engineering, Universidad Pública de Navarra.
- Lorenzo, P; M C Sánchez-Guerrero; E Medrano; M L García; I Caparrós; M Giménez. 2003. External greenhouse mobile shading: effect on microclimate, water use efficiency and yield of a tomato crop grown under different salinity levels of the nutrient solution. *Acta Horticulturae*. 609, 181-186.
- Lu, Jie; Shuye Qi; Ran Liu; Enyang Zhou; Wu Li; Shuhui Song; Donghai Han. 2015. Nondestructive determination of soluble solids and firmness in mix-cultivar melon using near-infrared CCD spectroscopy. *Journal of Innovative Optical Health Sciences* 8.
- Ma, Qing; Li-Jun Yue; Jin-Lin Zhang; Guo-Qiang Wu; Ai-Ke Bao; Suo-Min Wang. 2012. Sodium chloride improves photosynthesis and water status in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Tree Physiology* 32 (1):4-13.
- Maathuis, Frans J M. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12 (3):250-258.
- Madani, Babak; Amin Mirshekari; Elhadi Yahia. 2015. Effect of calcium chloride treatments on calcium content, *anthracnose* severity and antioxidant activity in papaya fruit during ambient storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Mahmud, T M M; A Al Eryani-Raqeeb; S R Syed Omar; A R Mohamed Zaki; Al E Abdul-Rahman. 2008. Effects of different concentrations and applications of calcium on storage life and physicochemical characteristics of papaya (*Carica papaya* L.). *American Journal of Agricultural and Biological Science*.
- Malavolta, E. 2006. *Manual de nutrição mineral de plantas*: Editora Agronomica Ceres Ltda.
- Mangas, J J; E Dapena; M S Rodriguez; J Moreno; M D Gutiérrez; D Blanco. 1992. Changes in pectic fractions during ripening-of cider apples. *Hortscience* 27 (4):328-330.

- Manley, Marena. 2014. Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: non-destructive analysis of biological materials. *Chemical Society Reviews* 43 (24):8200-8214.
- Marschner, Horst. 2012. *Mineral nutrition of higher plants*. 3 ed. San Diego: Academic press.
- Martens, Harald; Tormod Naes. 1984. Multivariate calibration. In *Chemometrics*, 147-156: Springer.
- Martinazzo, Emanuela G; Aline Ramm; Marcos A Bacarini. 2012. The chlorophyll a fluorescence as an indicator of the temperature stress in the leaves of *Prunus persica*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 24 (4):237-246.
- Martínez-Ferri, E; C Soria; M T Ariza; J J Medina; L Miranda; P Domínguez; J L Muriel. 2016. Water relations, growth and physiological response of seven strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) to different water availability. *Agricultural Water Management* 164:73-82.
- Martínez, Fátima; José A Oliveira; Eunice O Calvete; Pedro Palencia. 2017. Influence of growth medium on yield, quality indexes and SPAD values in strawberry plants. *Scientia Horticulturae* 217:17-27.
- Maxwell, Kate; Giles N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of experimental botany* 51 (345):659-668.
- McAinsh, Martin R; Jon K Pittman. 2009. Shaping the calcium signature. *New Phytologist* 181 (2): 275-294.
- Mditshwa, Asanda; Lembe S Magwaza; Samson Z Tesfay; Nokwazi Mbili. 2017. Postharvest quality and composition of organically and conventionally produced fruits: A review. *Scientia Horticulturae* 216:148-159.
- Melo, Hidelblandi F de; Edivan R de Souza; Jailson C Cunha. 2017. Fluorescence of chlorophyll a and photosynthetic pigments in *Atriplex nummularia* under abiotic stresses. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 21 (4):232-237.
- Menesatti, P; F Antonucci; F Pallottino; G Rocuzzo; M Allegra; F Stagno; F. Intrigliolo. 2010. Estimation of plant nutritional status by Vis-NIR spectrophotometric analysis on orange leaves [*Citrus sinensis* (L) Osbeck cv Tarocco]. *Biosystems Engineering* 105 (4):448-454.
- Mengel, Konrad. 2007. Potassium. In *Handbook of plant nutrition*, eds. A. V. Barker and D. J. Pilbeam, 91-120: CRC Press.
- Meurer, E J. 2006. Potássio. *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo:281-298.
- Mikulic-Petkovsek, Maja; Valentina Schmitzer; Ana Slatnar; Franci Stampar; Robert Veberic. 2012. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science* 77 (10): C1064-C1070.
- Miller, A J; M D Cramer. 2005. Root nitrogen acquisition and assimilation. In *Root Physiology: from Gene to Function*, 1-36: Springer.

- Mimoun, M Ben; M Marchand. 2013. Effects of potassium foliar fertilization on different fruit tree crops over five years of experiments. *Acta Horticulturae*.
- Mink, Pamela J; Carolyn G Scrafford; Leila M Barra; Lisa Harnack; Ching-Ping Hong; Jennifer A Nettleton; David R Jacobs. 2007. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition* 85 (3):895-909.
- Miszczak, Artur; Charles F Forney; Robert K Prange. 1995. Development of aroma volatiles and color during postharvest ripening of 'Kent' Strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120 (4):650-655.
- Mitcham, Elizabeth J. 2016. Strawberry. In *The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks*, ed. K.C.e.a. GROSS, 792. USDA, ARS: Agricultural Handbook.
- Mondal, Md F; Md Asaduzzaman; Makoto Ueno; Mikiko Kawaguchi; Shozo Yano; Takuya Ban; Hideyuki Tanaka; Toshiki Asao. 2017. Reduction of potassium (K) content in strawberry fruits through KNO<sub>3</sub> management of hydroponics. *The Horticulture Journal*.
- Montero, Teresa M; Esperanza M Mollá; Rosa M Esteban; Francisco J López-Andréu. 1996. Quality attributes of strawberry during ripening. *Scientia Horticulturae* 65 (4):239-250.
- Moraes, C A G de; P R Furlani. 1999. Cultivo de hortaliças de frutos em hidroponia em ambiente protegido. *Informe Agropecuário* 20 (200/201):105-113.
- Morales, R G F; L V Resende; I C Bordini; A G Galvão; F C Rezende. 2015. Caracterização do tomateiro submetido ao déficit hídrico. *Scientia Agraria* 16 (1).
- Morales, Rafael G F; Marcos V Faria; Juliano T V Resende; Adriano L Rossini, Rafaela Carminatti; Cacilda M D R Faria. 2012. Strawberry yield under supplementary organic fertilization in greenhouse. *Ambiência* 8 (1):23-33.
- Morard, P. 1984. Nutrition control of strawberries hydroponically grown in vertical columns using percolate analysis. Paper read at 6. International Congress on Soilless Culture, Lunteren (Netherlands), 29 Apr-5 May 1984.
- Morgano, M Antônio. 2005. Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- Moura, Sílvia C S R; Paulo E da R Tavares; Sílvia P M Germer; Alba L A C Nisida; Adriana B Alves; Alexandre S Kanaan. 2012. Degradation kinetics of anthocyanin of traditional and low-sugar blackberry Jam. *Food and Bioprocess Technology* 5 (6):2488-2496.
- Muckle, M E. 1993. Hydroponic Nutrients: Growers Press Inc.
- Murthy, B N S; F Karimi; R H Laxman. 2017. Physiological performance reflecting in yield and quality of strawberry under vertical soilless culture system. *Acta Horticulturae*. 1156, 301-308.



- Neilsen, G H; D Neilsen. 2011. Consequences of potassium, magnesium sulphate fertilization of high density 'Fuji' apple orchards. *Canadian Journal of Soil Science* 91 (6):1013-1027.
- Neuwald, Daniel Alexandre, Ivan Sestari, Dominikus Kitemann, Josef Streif, Anderson Weber; Auri Brackmann. 2014. Can mineral analysis be used as a tool to predict 'Braeburn' browning disorders (BBD) in apple in commercial controlled atmosphere (CA) storage in central Europe? *Erwerbs-Obstbau* 56 (1):35-41.
- Nguémazong, Doungla E; Ruben P Jolie; Ruth Cardinaels; Ilse Fraeye; Ann Van Loey; Paula Moldenaers; Marc Hendrickx. 2012. Stiffness of Ca<sup>2+</sup>-pectin gels: combined effects of degree and pattern of methylesterification for various Ca<sup>2+</sup> concentrations. *Carbohydrate Research* 348:69-76.
- Nicolai, Bart M; Katrien Beullens; Els Bobelyn; Ann Peirs; Wouter Saeys; Karen I Theron; Jeroen Lammertyn. 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology* 46 (2):99-118.
- Nieves-Cordones, Manuel; Anthony J Miller; Fernando Alemán; Vicente Martínez; Francisco Rubio. 2008. A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Molecular Biology* 68 (6):521.
- Nogata, Yoichi; Hideaki Ohta; A G J Voragen. 1993. Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry* 34 (3):617-620.
- Okada, Katsuhiko; Yasunori Inoue; Kazuhiko Satoh; Sakae Katoh. 1992. Effects of light on degradation of chlorophyll and proteins during senescence of detached rice leaves. *Plant and cell physiology* 33 (8):1183-1191.
- Oliveira, G Alves; Sylvie Bureau; Catherine M-G C Renard; Adauto B Pereira-Netto; Fernanda de Castilhos. 2014. Comparison of NIRS approach for prediction of internal quality traits in three fruit species. *Food Chemistry* 143:223-230.
- Oliveira, Gabrieli A de. 2014. Determinação de parâmetros de qualidade do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) por espectroscopia MID e NIR e calibração multivariada, Engenharia de Alimentos e à Ecole Doctoral Sciences des Procédés, Science des Aliments de l'Université d'Avignon et Pays de Vaucluse, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Oregel-Zamudio, Ernesto; M Valentina Angoa-Pérez; Guadalupe Oyoque-Salcedo; Cristóbal N Aguilar-González; Hortencia G Mena-Violante. 2017. Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life. *Scientia Horticulturae* 214:273-279.
- Oren, R; J S Sperry; G G Katul; D E Pataki; B E Ewers; N Phillips; K V R Schäfer. 1999. Survey and synthesis of intra-and interspecific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. *Plant, Cell & Environment* 22 (12):1515-1526.
- Osborne, Brian G; Thomas Fearn; Peter H Hindle. 1993. *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*: Longman scientific and technical.
- Palencia, Pedro; Fátima Martínez; Maribela Pestana; José A Oliveira; Pedro J Correia. 2015. Effect of *Bacillus velezensis* and *Glomus intraradices* on fruit quality and

- growth parameters in strawberry soilless growing system. *The Horticulture Journal* 84 (2):122-130.
- Palha, M da Graça. 2005. A planta do Morangueiro In *Manual do Morangueiro*, ed. P. P. A D D. nº193, 125. Portugal.
- Palmgren, Michael G. 2001. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Biology* 52 (1):817-845.
- Panico, A M; F Garufi; S Nitto; R Di Mauro; R C Longhitano; G Magri; A Catalfo; M E Serrentino; G de Guidi. 2009. Antioxidant activity and phenolic content of strawberry genotypes from *Fragaria x ananassa*. *Pharmaceutical Biology* 47 (3):203-208.
- Paranjpe, Ashwin V; Daniel J Cantliffe; Elizabeth M Lamb; Peter J Stoffella; Charles Powell. 2003. Winter strawberry production in greenhouses using soilless substrates: an alternative to methyl bromide soil fumigation. *Proceedings of the Florida State for Horticultural Science* 116 (1):98-105.
- Paraskevopoulou-Paroussi, G; M Vassilakakis; C Dogras. 1993. Effects of temperature, duration of cold storage and packaging on postharvest quality of strawberry fruit. Paper read at International Symposium on Quality of Fruit and Vegetables: Influence of Pre-and Post-Harvest Factors and Technology 379.
- Park, Sunghun; Ning H Cheng; Jon K Pittman; Kil S Yoo; Jungeun Park; Roberta H Smith; Kendal D Hirschi. 2005. Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> transporters. *Plant Physiology* 139 (3):1194-1206.
- Pavia, Donald L; Gary M Lampman; George S Kriz; James A Vyvyan. 2008. *Introduction to spectroscopy*. Cengage Learning.
- Payasi, A; N N Mishra; A L S Chaves; R Singh. 2009. Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiol Mol Biol Plants* 15 (2):103-113.
- Pestana, Maribela; Irina Domingos; Florinda Gama; Susana Dandlen; Maria G Miguel; João C Pinto; Amarilis de Varennes; Pedro José Correia. 2011. Strawberry recovers from iron chlorosis after foliar application of a grass-clipping extract. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174 (3):473-479.
- Pittman, J K; K D Hirschi. 2016. CAX-ing a wide net: Cation/H(+) transporters in metal remediation and abiotic stress signalling. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 18 (5):741-749.
- Prado, R de M. 2008. Pótassio. In *Nutrição de plantas*, p.161-181. São Paulo: Editora Unesp.
- Ramos, Alessandro C; Arnaldo R Façanha; Livia M Palma; Lev A Okorokov; Zilma Cruz; Ary G Silva; Arthur F Siqueira; Amanda A Bertolazi; Gabriela C Canton; Juliana Melo. 2011. An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 23 (1):79-89.
- Raven, Peter H; Ray F Evert; Susan E Eichhorn. 2005. *Biology of plants*: Macmillan.

- Recamales, Angeles F; Jose L Medina; Dolores Hernanz. 2007. Physicochemical characteristics and mineral content of strawberries grown in soil and soilless system. *Journal of Food Quality* 30 (5):837-853.
- Redgwell, Robert J; Elspeth MacRae; Ian Hallett; Monica Fischer; Jo Perry; Roger Harker. 1997. *In vivo* and *in vitro* swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203 (2):162-173.
- Reekie, J Y; P C Struik; P R Hicklenton; J R Duval. 2007. Dry matter partitioning in a nursery and a plasticulture fruit field of strawberry cultivars 'Sweet Charlie' and 'Camarosa' as affected by prohexadione-calcium and partial leaf removal. *European Journal of Horticultural Science*:122-129.
- Reganold, John P; Preston K; Andrews Jennifer R; Reeve L Carpenter-Boggs; Christopher W Schadt; J Richard Alldredge; Carolyn F Ross; Neal M Davies; Jizhong Zhou. 2010. Fruit and soil quality of organic and conventional strawberry agroecosystems. *Plos One* 5 (9):e12346.
- Rengel, Zed; Paul M Damon. 2008. Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. *Physiologia Plantarum* 133 (4):624-636.
- Resch, Howard M. 1992. Cultivos hidropónicos: nuevas técnicas de producción.
- Resende, Juliano T V; Letícia K P Camargo; Eliana J S Argandoña; Aline Marchese; Cristhiano K Camargo. 2008. Sensory analysis and chemical characterization of strawberry fruits. *Horticultura Brasileira* 26 (3):371-374.
- Rinnan, Åsmund; Frans van den Berg; Søren B Engelsen. 2009. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28 (10):1201-1222.
- Rodriguez-Saona, Luis E; Fredrick S Fry; Michael A McLaughlin; Elizabeth M Calvey. 2001. Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 336 (1):63-74.
- Roggo, Yves; Pascal Chalus; Lene Maurer; Carmen Lema-Martinez; Aurélie Edmond; Nadine Jent. 2007. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44 (3):683-700.
- Römheld, Volker; Ernest A Kirkby. 2010. Research on potassium in agriculture: needs and prospects. *Plant and Soil* 335 (1):155-180.
- Roosta, Hamid R. 2014. Effect of Ammonium: nitrate ratios in the response of strawberry to alkalinity in hydroponics. *Journal of Plant Nutrition* 37 (10):1676-1689.
- Rossa, Überson B; Alessandro C Angelo; Silvana Nisgoski; Danielle J Westphalen; Cátia N T Frizon; Rosemary Hoffmann-Ribani. 2015. Application of the NIR method to determine nutrients in yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill) leaves. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 46 (18):2323-2331.
- Rousseau-Gueutin, M; A Gaston; A Aïnouche; M L Aïnouche; K Olbricht; G Staudt; L Richard; B Denoyes-Rothan. 2009. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses

- of low-copy nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51 (3):515-530.
- Ruan, Jiwei; Young H Lee; Sae J Hong; Young R Yeoung. 2013. Sugar and organic acid contents of day-neutral and ever-bearing strawberry cultivars in high-elevation for summer and autumn fruit production in Korea. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 54 (3):214-222.
- Sánchez, María-Teresa; María-José de la Haba; José-Emilio Guerrero; Ana Garrido-Varo; Dolores Pérez-Marín. 2011. Testing of a local approach for the prediction of quality parameters in intact nectarines using a portable NIRS instrument. *Postharvest Biology and Technology* 60 (2):130-135.
- Sanhueza, R M V; A Hoffmann; L E C Antunes; J de M Freire. 2011. Sistema de produção de morango para mesa na região da serra gaúcha e encosta superior do nordeste. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/importancia.htm>
- Sarooshi, R A; G C Cresswell. 1994. Effects of hydroponic solution composition, electrical conductivity and plant spacing on yield and quality of strawberries. *Animal Production Science* 34 (4):529-535.
- Saure, Max C. 2005. Calcium translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. *Scientia Horticulturae* 105 (1):65-89.
- Savitzky, Abraham; Marcel J E Golay. 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical chemistry* 36 (8):1627-1639.
- Schachtman, Daniel P; Ryoung Shin. 2007. Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:47-69.
- Schröder, J J; J J Neeteson; O Oenema; P C Struik. 2000. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? *Field Crops Research* 66 (2):151-164.
- Schwarz, K; J T Resende; C P Junior; A P Preczenhak; A Quartiero; D K Zanin. 2011. Qualidade pós-colheita de frutos de morangueiro cultivados com diferentes fontes e doses de potássio. *Horticultura Brasileira* 29:5272-5280.
- Schwieterman, Michael L; Thomas A Colquhoun; Elizabeth A Jaworski; Linda M Bartoshuk; Jessica L Gilbert; Denise M Tieman; Asli Z Odabasi; Howard R Moskowitz; Kevin M Folta; Harry J Klee; Charles A Sims; Vance M Whitaker; David G Clark. 2014. Strawberry flavor: Diverse chemical compositions, a seasonal influence and effects on sensory perception. *Plos One* 9 (2).
- Selvendran, Robert R; Malcolm A O'Neill. 2006. Isolation and analysis of cell walls from plant material. *Methods of Biochemical Analysis, Volume* 32:25-153.
- Senevirathna, Pawank; Wam Daundasekera. 2010. Effect of postharvest calcium chloride vacuum infiltration on the shelf life and quality of tomato (cv.'Thilina'). *Ceylon Journal of science (Biological Sciences)* 39 (1).

- Shabala, Sergey; Igor I Pottosin. 2010. Potassium and potassium-permeable channels in plant salt tolerance. In *Ion Channels and Plant Stress Responses*, 87-110: Springer.
- Sharma, R R; Rajbir Singh. 2008. Fruit nutrient content and lipoxygenase activity in relation to the production of malformed and button berries in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae* 119 (1):28-31.
- Shaw, D V; K D Larson. 2009. Strawberry plant named 'Portola': Google Patents.
- Shin, Ryoung; Daniel P Schachtman. 2004. Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (23):8827-8832.
- Shiratake, Katsuhiko; Yoshinori Kanayama; Masayoshi Maeshima; Shohei Yamaki. 1997. Changes in H<sup>+</sup>-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. *Plant and cell physiology* 38 (9):1039-1045.
- Shu, Sheng; Ling-Yun Yuan; Shi-Rong Guo; Jin Sun; Ying-Hui Yuan. 2013. Effects of exogenous spermine on chlorophyll fluorescence, antioxidant system and ultrastructure of chloroplasts in *Cucumis sativus* L. under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 63:209-216.
- Siesler, Heinz W; Yukihiro Ozaki; Satoshi Kawata; H M Heise. 2008. *Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications*: John Wiley & Sons.
- Silva, W B G; M C Silva; L R da Silva; W R Waldman; J G de Oliveira. 2015. Treatment with calcium chloride at postharvest delays the degreening and loss of firmness of papaya/uenf/caliman01. *Revista Brasileira de Fruticultura* 37 (3):588-599.
- Singh, B P; D K Tandon; S K Kalra. 1993. Changes in postharvest quality of mangoes affected by preharvest application of calcium salts. *Scientia Horticulturae* 54 (3):211-219.
- Singh, P; H C Andola; M S M Rawat; G J N Pant; V K Purohit. 2011. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy in An-Overview. *Research Journal of Medicinal Plants* 5:127-135.
- Sirisomboon, Panmanas; Munehiro Tanaka; Takayuki Kojima; Phil Williams. 2012. Nondestructive estimation of maturity and textural properties on tomato 'Momotaro' by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering* 112 (3):218-226.
- Sogvar, Ommol B; Mahmoud K Saba; Aryou Emamifar; Rahman Hallaj. 2016. Influence of nano-ZnO on microbial growth, bioactive content and postharvest quality of strawberries during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 35:168-176.
- Sonneveld, C; N Straver. 1994. Nutrient solution for vegetables and flowers grown in water or substrates. Series Voedingsoplossingen Glastuinbouw No. 8 (p. 39). *Naaldwijk-Aalsmeer: PBG*.

- Sousa, G Gomes; Thales V de A Viana; Ednângelo D Pereira; André H P Albuquerque; Albanise B Marinho; Benito M de Azevedo. 2014. Fertirrigação potássica na cultura do morango no litoral Cearense. *Bragantia* 73 (1):1-6.
- Souza, A L B; S P Q Scalon; M I F Chitarra; A B Chitarra. 1999. Post-harvest application of CaCl<sub>2</sub> in strawberry fruits (*Fragaria ananassa* Dutch cv. Sequóia): evaluation of fruit quality and post-harvest life. *Ciencia E Agrotecnologia* 23 (4):841-848.
- Spalding, Edgar P; Rebecca E Hirsch; Daniel R Lewis; Zhi Qi; Michael R Sussman; Bryan D Lewis. 1999. Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity. *The Journal of general physiology* 113 (6):909-918.
- Srivastava, Alaka; Reto J Strasser. 1999. Greening of peas: parallel measurements of 77 K emission spectra, OJIP chlorophyll a fluorescence transient, period four oscillation of the initial fluorescence level, delayed light emission, and P700. *Photosynthetica* 37 (3):365-392.
- Srivastava, Prashant; Prakash C Srivastava; Upasana Srivastava; Uma S Singh. 2008. Effect of sample preparation methods on analytical values of some micro-and secondary nutrients in plant tissues. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39 (13-14):2046-2052.
- Strasser, Reto J; Alaka Srivastava; M Tsimilli-Michael. 2004. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, eds. G. C. Papageorgiou and Govindjee, 321-362. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Sun, Youping; Genhua Niu; Russ Wallace; Joseph Masabni; Mengmeng Gu. 2015. Relative salt tolerance of seven strawberry cultivars. *Horticulturae* 1 (1):27-43.
- Taiz, L; E Zeiger. 2012. Plant physiology 5th Ed. *Sunderland, MA: Sinauer Associates*.
- Tibbits, C William; Alistair J MacDougall; Stephen G Ring. 1998. Calcium binding and swelling behaviour of a high methoxyl pectin gel. *Carbohydrate Research* 310 (1):101-107.
- Tomemori, Hisashi; Kunio Hamamura; Kenji Tanabe. 2002. Interactive effects of sodium and potassium on the growth and photosynthesis of spinach and komatsuna. *Plant production science* 5 (4):281-285.
- Treftz, Chenin; Fannie Zhang; Stanley T Omaye. 2015a. Comparison between hydroponic and soil-grown strawberries: Sensory attributes and correlations with nutrient content. *Food and Nutrition Sciences* Vol.06No.15:10.
- Treftz, Chenin; Stanley T Omaye. 2015b. Nutrient analysis of soil and soilless strawberries and raspberries grown in a greenhouse. *Food and Nutrition Sciences* 6 (09):805.
- Turner, Neil C. 1988. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation science* 9 (4):289-308.
- Tuteja, Narendra; Shilpi Mahajan. 2007. Calcium signaling network in plants: An overview. *Plant Signaling & Behavior* 2 (2):79-85.

- USDA - Department of Agriculture, Agriculture Research Service. 2017. Strawberry - Fruits and fruit juices, ed. U n n f s r s. revised. May, 2016.
- Van der Boon, J. 1980. Prediction and control of bitter pit in apples. I. Prediction based on mineral leaf composition, cropping levels and summer temperatures. *Journal of Horticultural Science* 55 (3):307-312.
- Van Maarschalkerweerd Marie; Ro Bro; Max Egebo; Søren Husted. 2013. Diagnosing latent copper deficiency in intact barley leaves (*Hordeum vulgare*, L.) using near infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (46).
- Van Maarschalkerweerd Marie; Søren Husted. 2015. Recent developments in fast spectroscopy for plant mineral analysis. *Frontiers in Plant Science* 6.
- Vance, Amanda J; Patrick Jones; Bernadine C Strik. 2017. Foliar calcium applications do not improve quality or shelf life of strawberry, raspberry, blackberry, or blueberry Fruit. *Hortscience* 52 (3):382-387.
- Vandesompele, Jo; Katleen De Preter; Filip Pattyn; Bruce Poppe; Nadine Van Roy; Anne De Paepe; Frank Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3 (7):research0034. 0031.
- Velada, Isabel; Hélia G Cardoso; Carla Ragonezi; Amaia Nogales; Alexandre Ferreira; Vera Valadas; Birgit Arnholdt-Schmitt. 2016. Alternative oxidase gene family in *Hypericum perforatum* L.: characterization and expression at the post-germinative phase. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Verdini, R A; S E Zorrilla; A C Rubiolo. 2008. Calcium uptake during immersion of strawberries in CaCl<sub>2</sub> solutions. *Journal of Food Science* 73 (7):C533-C539.
- Vicente, Ariel R; Montserrat Saladie; Jocelyn K C Rose; John M Labavitch. 2007. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87 (8):1435-1448.
- Walker, David J; Roger A Leigh; Anthony J Miller. 1996. Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (19):10510-10514.
- Wang, Min; Qingsong Zheng; Qirong Shen; Shiwei Guo. 2013. The critical role of potassium in plant stress response. *International Journal of Molecular Sciences* 14 (4):7370.
- Wang, Y; W H Wu. 2013. Potassium transport and signaling in higher plants. In *Annual Review of Plant Biology, Vol 64*, ed. S. S. Merchant, 451-476. Palo Alto: Annual Reviews.
- Ward, Alastair; Anne L Nielsen; Henrik Møller. 2011. Rapid assessment of mineral concentration in meadow grasses by near infrared reflectance spectroscopy. *Sensors* 11 (5):4830-4839.
- Whitaker, Vance M; Tomas Hasing; Craig K Chandler; Anne Plotto; Elizabeth Baldwin. 2011. Historical trends in strawberry fruit quality revealed by a trial of University of Florida cultivars and advanced selections. *Hortscience* 46 (4):553-557.

- White, Philip J; Alison J Karley. 2010. Potassium. In *Cell biology of metals and nutrients*, 199-224: Springer.
- White, Philip J; Martin R. Broadley. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92 (4):487-511.
- Williams, P. 2004. *Near-infrared technology: Getting the best out of light*. 2ed. Canada: Value Added Wheat.
- Williams, Phil. 2014. Tutorial: The RPD statistic: a tutorial note. *NIR news* 25 (1):22-26.
- Williams, Phil; Karl Norris. 1987. *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*: American Association of Cereal Chemists, Inc.
- Woodward, J R. 1972. Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 23 (4):465-473.
- Workman, J; J Shenk. 2004. Understanding and using the near-infrared spectrum as an analytical method. In *Near-infrared Spectroscopy Agriculture*, 3-10.
- Wozniak, W; B Radajewska; A Reszelska-Sieciechowicz; I Dejwor. 1996. Sugars and acid content influence organoleptic evaluation of fruits of six strawberry cultivars from controlled cultivation. Paper read at III International Strawberry Symposium 439.
- Wu, Di; Da-Wen Sun. 2013. Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review - Part I: Fundamentals. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 19:1-14.
- Xiaobo, Zou; Zhao Jiewen; Malcolm J W Povey; Mel Holmes; Mao Hanpin. 2010. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 667 (1):14-32.
- Xie, Lijuan; Xingqian Ye; Donghong Liu; Yibin Ying. 2009. Quantification of glucose, fructose and sucrose in bayberry juice by NIR and PLS. *Food Chemistry* 114 (3):1135-1140.
- Yadav, Brijesh; Chiranjeev Kumawat; Anil K Verma; Dinesh K Yadav; Poonam Yadav. 2017. Fluorescence imaging for crop stress monitoring: A Review. *International Journal Current Microbiology and Applied Science* 6 (4):568-575.
- Yaghubi, Khatere; Nasser Ghaderi; Yavar Vafae; Taimoor Javadi. 2016. Potassium silicate alleviates deleterious effects of salinity on two strawberry cultivars grown under soilless pot culture. *Scientia Horticulturae* 213:87-95.
- Yamane, Yoshihiro; Toshiharu Shikanai; Yasuhiro Kashino; Hiroyuki Koike; Kazuhiko Satoh. 2000. Reduction of Q A in the dark: another cause of fluorescence Fo increases by high temperatures in higher plants. *Photosynthesis Research* 63 (1): 23-34.
- Yang, Baoru; Maaria Kortensniemi. 2015. Clinical evidence on potential health benefits of berries. *Current Opinion in Food Science* 2:36-42.



- Yavari, Sara; Saeid Eshghi; Enayatollah Tafazoli; Najafali Karimian. 2009. Mineral elements uptake and growth of strawberry as influenced by organic substrates. *Journal of Plant Nutrition* 32 (9): 1498-1512.
- Zhao, Yan; Chen Wang. 2015. Effect of calcium chloride in combination with salicylic acid on post-harvest freshness of apples. *Food Science and Biotechnology* 24 (3): 1139-1146.
- Zhou, Aimin, Yuanyuan Bu, Tetsuo Takano, Xinxin Zhang; Shenkui Liu. 2016. Conserved V-ATPase c subunit plays a role in plant growth by influencing V-ATPase-dependent endosomal trafficking. *Plant biotechnology journal* 14 (1):271-283.
- Zsivanovits, Gabor; Alistair J MacDougall; Andrew C Smith; Stephen G Ring. 2004. Material properties of concentrated pectin networks. *Carbohydrate Research* 339 (7):1317-1322.



**ANEXOS**

---



**Tabela 1.** Resultados analíticos da água utilizada na rega dos morangueiros de Ensaio I (Análise realizada em 01/12/2014).

DETERMINAÇÃO	MÉTODO	DATA DE INÍCIO	RESULTADO	UNIDADE	CRITÉRIOS
Det de metais dissolvidos totais	W-METAXFL1 #	2014/12/01			
Alumínio			<0,010LQ	mg/l Al	(3) VMA 20 mg/l
Arsênio			<0,0050LQ	mg/l As	(3) VMA 10 mg/l
Bário			0,109	mg/l Ba	(3) VMR 1,0 mg/l
Berílio			<0,00020LQ	mg/l Bè	(3) VMA 1,0 mg/l
Boro			0,026	mg/l B	(3) VMA 3,75 mg/l
Cádmio			<0,00040LQ	mg/l Cd	(3) VMA 0,05 mg/l
Cálcio			88,0	mg/l Ca	
Chumbo			<0,0050LQ	mg/l Pb	(3) VMA 20 mg/l
Cobalto			<0,0020LQ	mg/l Co	(3) VMA 10 mg/l
Cobre			0,0101	mg/l Cu	(3) VMA 5,0 mg/l
Crômio			<0,0010LQ	mg/l Cr	(3) VMA 20 mg/l
Ferro			0,0076	mg/l Fe	(3) VMR 5,0 mg/l
Lítio			0,0162	mg/l Li	(3) VMA 5,8 mg/l
Magnésio			25,5	mg/l Mg	
Manganês			0,00133	mg/l Mn	(3) VMA 10 mg/l
Molibdênio			<0,0020LQ	mg/l Mo	(3) VMA 0,05 mg/l
Níquel			0,0025	mg/l Ni	(3) VMA 2,0 mg/l
Selênio			<0,010LQ	mg/l Se	(3) VMA 0,05 mg/l
Sódio			43,6	mg/l Na	
Vanádio			0,0061	mg/l V	(3) VMA 1,0 mg/l
Zinco			0,0163	mg/l Zn	(3) VMA 10,0 mg/l
Det de metais dissolvidos totais	W-METAXFL2 #	2014/12/01			
Estanho			<0,010LQ	mg/l Sn	(3) VMR 2,0 mg/l
Det de salinidade	W-SALCON #	2014/12/01	0,3	ppt	
Det de condutividade elétrica a 20°C	NP EN 27888:96 *	2014/11/28	710	µS/cm	(3) VMR 1000µS/cm
Det de sólidos dissolv. totais (105°C)	W-TDS-GR #	2014/12/01	472	mg/l	(3) VMR 640 mg/l
Det de SAR	PAFQ 981.0 *	2014/12/01	1	meq/l	(3) VMR 8 meq/l

DETERMINAÇÃO	MÉTODO	DATA DE INÍCIO	RESULTADO	UNIDADE	CRITÉRIOS
Det de sólidos suspensos totais	W-TSS45-GR #	2014/12/01	<5,0LQ	mg/l	(3) VMR 60 mg/l
Det de sulfatos	W-SO4-IC #	2014/12/01	42,0	mg/l SO4	(3) VMR 575 mg/l
Det de pH (20°C)	PAFQ 992.3 *	2014/11/28	6,9	Sorensen	(3) VMA 4,5-9,0
Det de nitratos	W-NO3-IC #	2014/12/01	39,1	mg/l NO3	(3) VMR 50 mg/l
Det de cloretos	W-CL-IC #	2014/12/01	51,4	mg/l Cl	(3) VMR 70 mg/l
Det de flúor	W-F-IC #	2014/12/01	<0,200LQ	mg/l F	(3) VMA 15 mg/l
Contagem de coliformes fecais (MF)	PAM 28.1 *	2014/11/28	0	UFC/100ml	(3) VMR 100UFC/100ml
Det de ovos de parasitas intestinais	Método Interno * #	2014/12/01	Ausente	1000ml	(3) VAM 1UFC/1000ml

**Tabela 2.** Matriz de correlação entre as características fisiológicas ( $PI_{\text{abs}}$ ,  $F_v/F_m$ , SPAD FJ, SPAD FA,  $tF_{10h}$ ,  $g_s10h$ ,  $tF_{12h}$ ,  $g_s12h$  e  $\Psi_w$ ) avaliadas na 13ª semana (1ª avaliação) e 24ª semana (2ª avaliação) após a transplantação dos morangueiros cv. San Andreas em função das doses de K na solução nutritiva (1,8; 4,2; 5,7; 7,4 e 9,8 mmol L<sup>-1</sup>).

13ª semana após a transplantação dos morangueiros (1ª avaliação)										
	Dose	$PI_{\text{abs}}$	$F_v/F_m$	SPAD FJ	SPAD FA	$tF_{10h}$	$g_s10h$	$tF_{12h}$	$g_s12h$	$\Psi_w$
Dose	1									
$PI_{\text{abs}}$	<b>0,27**</b>	1								
$F_v/F_m$	ns	<b>0,57**</b>	1							
SPAD FJ	ns	ns	<b>-0,18*</b>	1						
SPAD FA	ns	ns	ns	ns	1					
$tF_{10h}$	ns	ns	ns	<b>0,37**</b>	ns	1				
$g_s10h$	ns	ns	ns	<b>0,39**</b>	ns	<b>0,88**</b>	1			
$tF_{12h}$	ns	ns	ns	<b>-0,22*</b>	ns	<b>-0,58**</b>	<b>-0,62**</b>	1		
$g_s12h$	ns	<b>-0,23*</b>	ns	ns	ns	<b>0,59**</b>	<b>0,72**</b>	<b>-0,57**</b>	1	
$\Psi_w$	ns	ns	ns	<b>0,53**</b>	ns	<b>0,80**</b>	<b>0,78**</b>	<b>-0,67**</b>	<b>0,55**</b>	1
24ª semana após a transplantação dos morangueiros (2ª avaliação)										
	Dose	$PI_{\text{abs}}$	$F_v/F_m$	SPAD FJ	SPAD FA	$tF_{10h}$	$g_s10h$	$tF_{12h}$	$g_s12h$	$\Psi_w$
Dose	1									
$PI_{\text{abs}}$	ns	1								
$F_v/F_m$	<b>-0,32**</b>	ns	1							
SPAD FJ	ns	<b>0,25*</b>	ns	1						
SPAD FA	<b>-0,17*</b>	ns	ns	ns	1					
$tF_{10h}$	ns	ns	<b>-0,48**</b>	ns	ns	1				
$g_s10h$	ns	ns	ns	<b>-0,19*</b>	ns	ns	1			
$tF_{12h}$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1		
$g_s12h$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<b>0,52**</b>	ns	1	
$\Psi_w$	<b>0,22*</b>	ns	<b>0,22*</b>	ns	<b>-0,28**</b>	<b>-0,66**</b>	ns	<b>-0,65**</b>	ns	1

\* e \*\*, F significativo a 5% ( $p \leq 0,05$ ) e a 1% ( $p \leq 0,01$ ) de probabilidade, respetivamente; ns – não significativo.



**Figura 1.** Visão geral do Ensaio I em sistema semi-hidropónico em areia.

**Tabela 1.** Resultados analíticos da água utilizada na rega dos morangueiros de Ensaio II (Análise realizada em 21/01/2016).

DETERMINAÇÃO	MÉTODO	DATA DE INÍCIO	RESULTADO	UNIDADE	CRITÉRIOS
Det de metais dissolvidos totais	W-METAXFL1 #	2016/01/21			
Alumínio			<0,010LQ mg/l	Al	(3) VMA 20 mg/l
Arsénio			<0,0050LQ mg/l	As	(3) VMA 10 mg/l
Bário			0,0968 mg/l	Ba	(3) VMR 1,0 mg/l
Berílio			<0,00020LQ mg/l	Be	(3) VMA 1,0 mg/l
Boro			0,014 mg/l	B	(3) VMA 3,75 mg/l
Cádmio			<0,00040LQ mg/l	Cd	(3) VMA 0,05 mg/l
Cálcio			78,2 mg/l	Ca	
Chumbo			<0,0050LQ mg/l	Pb	(3) VMA 20 mg/l
Cobalto			<0,0020LQ mg/l	Co	(3) VMA 10 mg/l
Cobre			0,0131 mg/l	Cu	(3) VMA 5,0 mg/l
Crómio			<0,0010LQ mg/l	Cr	(3) VMA 20 mg/l
Ferro			<0,0020LQ mg/l	Fe	(3) VMR 5,0 mg/l
Lítio			0,0168 mg/l	Li	(3) VMA 5,8 mg/l
Magnésio			23,9 mg/l	Mg	
Manganês			<0,00050LQ mg/l	Mn	(3) VMA 10 mg/l
Molibdénio			<0,0020LQ mg/l	Mo	(3) VMA 0,05 mg/l
Níquel			<0,0020LQ mg/l	Ni	(3) VMA 2,0 mg/l
Selénio			<0,010LQ mg/l	Se	(3) VMA 0,05 mg/l
Sódio			33,2 mg/l	Na	
Vanádio			0,0034 mg/l	V	(3) VMA 1,0 mg/l
Zinco			0,0157 mg/l	Zn	(3) VMA 10,0 mg/l
Det de metais dissolvidos totais	W-METAXFL2 #	2016/01/21			
Estanho			<0,010LQ mg/l	Sn	(3) VMR 2,0 mg/l
Det de condutividade elétrica a 20°C	NP EN 27888:96 *	2016/01/21	579	µS/cm	(3) VMR 1000 µS/cm
Det de salinidade (cálculo)	PAFQ 973.0 *	2016/01/21	<2,0LQ	ppt	
Det de SAR (cálculo)	PAFQ 981.0 *	2016/01/21	0,84	meq/l	(3) VMR 8 meq/l
Det de sólidos dissolv. totais (105°C)	PAFQ 975.0 *	2016/01/25	438	mg/l	(3) VMR 640 mg/l
DETERMINAÇÃO	MÉTODO	DATA DE INÍCIO	RESULTADO	UNIDADE	CRITÉRIOS
Det de SST (105°C)	PAFQ 968.0 *	2016/01/25	<5,0LQ	mg/l	(3) VMR 60 mg/l
Det de sulfatos	W-SO4-IC #	2016/01/21	35,2	mg/l SO4	(3) VMR 575 mg/l
Det de pH (20°C)	PAFQ 992.3 *	2016/01/21	7,4	Sorensen	(3) 4,5-9,0 Sorensen
Det de cloretos	W-CL-IC #	2016/01/21	55,0	mg/l Cl	(3) VMR 70 mg/l
Det de flúor	W-F-IC #	2016/01/21	<0,200LQ	mg/l F	(3) VMA 15 mg/l
Det de nitratos	PAFQ 990.3 *	2016/01/25	12	mg/l NO3	(3) VMR 50 mg/l
Contagem de coliformes fecais (MF)	PAM 28.1 *	2016/01/21	0	UFC/100ml	(3) VMR 100UFC/100ml
Det de ovos de parasitas intestinais	Método Interno * #	2016/01/21	Ausente	1000ml	(3) VMA 1UFC/1000ml



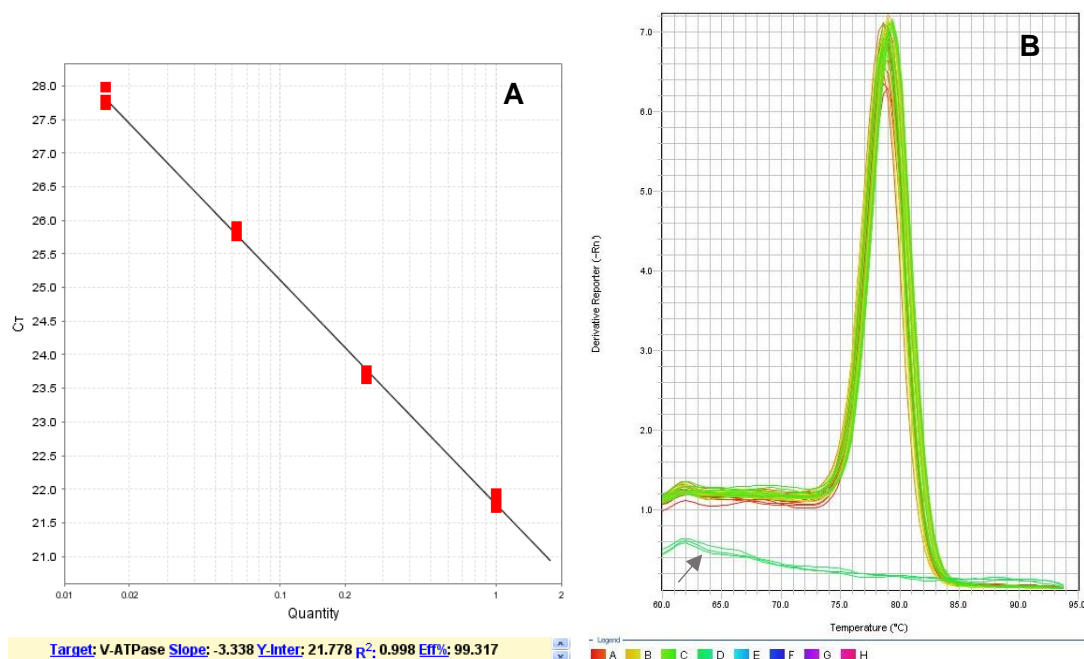
**Tabela 2.** Matriz de correlação entre as características fisiológicas ( $PI_{abs}$ ,  $F_v/F_m$ , SPAD FJ, SPAD FA,  $tF_{10h}$ ,  $g_s10h$ ,  $tF_{12h}$ ,  $g_s12h$  e  $\Psi_w$ ) avaliadas na 15ª semana (1ª avaliação) e 33ª semana (2ª avaliação) após a transplantação dos morangueiros cv. Primoris em função das doses de K na solução nutritiva (2,15; 4,15; 6,15, 8,15 e 10,15 mmol L<sup>-1</sup>).

15ª semana após a transplantação dos morangueiros (1ª Avaliação)										
	Dose	$PI_{abs}$	$F_v/F_m$	SPAD FJ	SPAD FA	$tF_{10h}$	$g_s10h$	$tF_{12h}$	$g_s12h$	$\Psi_w$
Dose	1									
$PI_{abs}$	ns	1								
$F_v/F_m$	ns	<b>0,75**</b>	1							
SPAD FJ	<b>0,18*</b>	<b>0,55**</b>	<b>0,28**</b>	1						
SPAD FA	ns	<b>0,23*</b>	ns	ns	1					
$tF_{10h}$	ns	<b>0,22*</b>	ns	<b>0,35**</b>	ns	1				
$g_s10h$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1			
$tF_{12h}$	ns	<b>0,27**</b>	ns	<b>0,43**</b>	ns	ns	<b>0,93**</b>	1		
$g_s12h$	ns	ns	ns	<b>-0,39**</b>	ns	ns	<b>-0,26**</b>	<b>-0,39**</b>	1	
$\Psi_w$	ns	ns	ns	<b>-0,24*</b>	ns	ns	<b>-0,43**</b>	<b>-0,45**</b>	ns	1
33ª semana após a transplantação dos morangueiros (2ª Avaliação)										
	Dose	$PI_{abs}$	$F_v/F_m$	SPAD FJ	SPAD FA	$tF_{10h}$	$g_s10h$	$tF_{12h}$	$g_s12h$	$\Psi_w$
Dose	1									
$PI_{abs}$	<b>0,48**</b>	1								
$F_v/F_m$	<b>0,48**</b>	<b>0,81**</b>	1							
SPAD FJ	<b>0,35*</b>	ns	ns	1						
SPAD FA	<b>0,53**</b>	ns	ns	ns	1					
$tF_{10h}$	ns	ns	ns	ns	ns	1				
$g_s10h$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1			
$tF_{12h}$	<b>-0,53**</b>	<b>-0,39*</b>	<b>-0,39*</b>	ns	<b>-0,45**</b>	ns	ns	1		
$g_s12h$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<b>-0,39*</b>	1	
$\Psi_w$	<b>-0,40**</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1

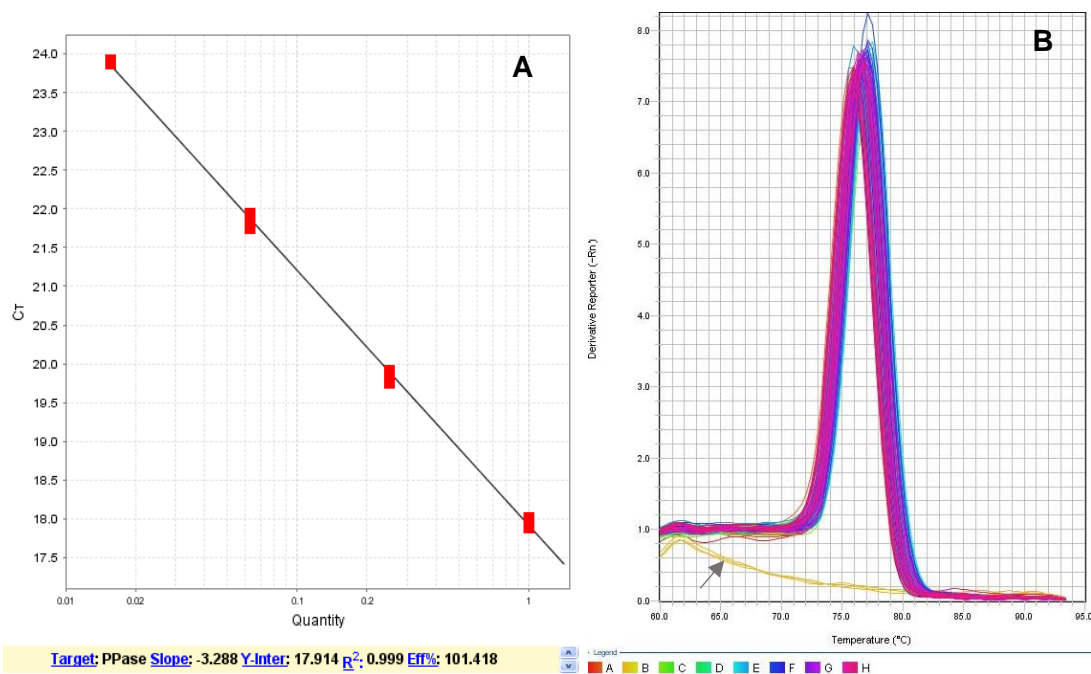
\* e \*\*, F significativo a 5% ( $p \leq 0,05$ ) e a 1% ( $p \leq 0,01$ ) de probabilidade, respetivamente; ns – não significativo.



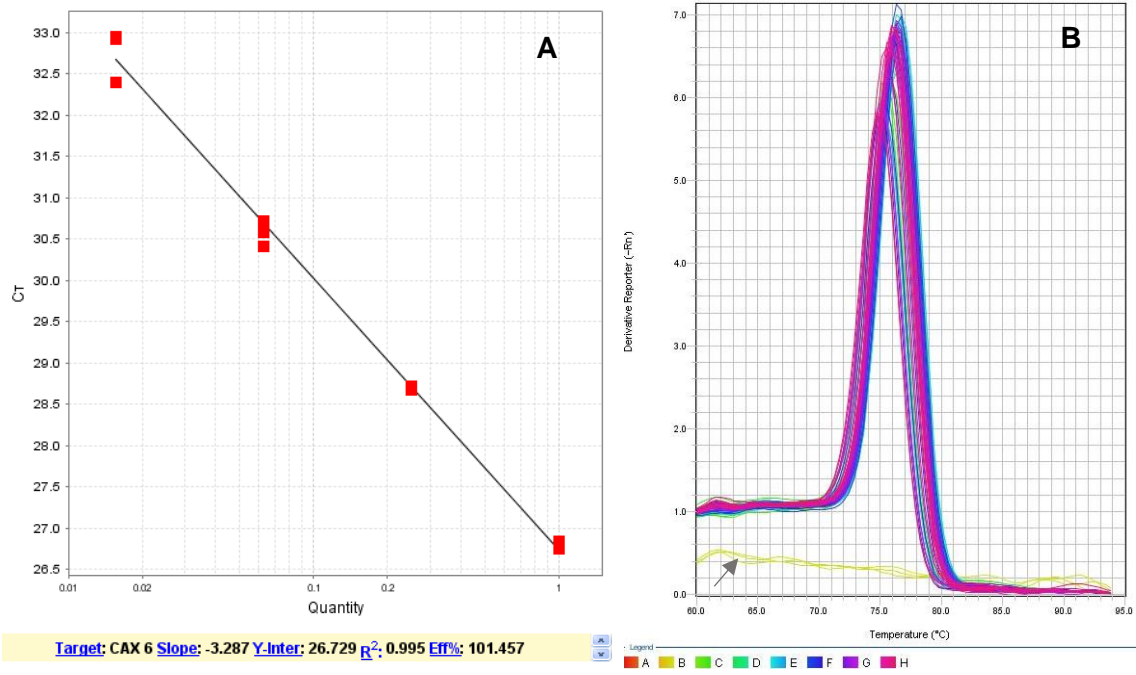
**Figura 1.** Visão geral do Ensaio II em sistema semi-hidropónico NGS® em substrato orgânico.



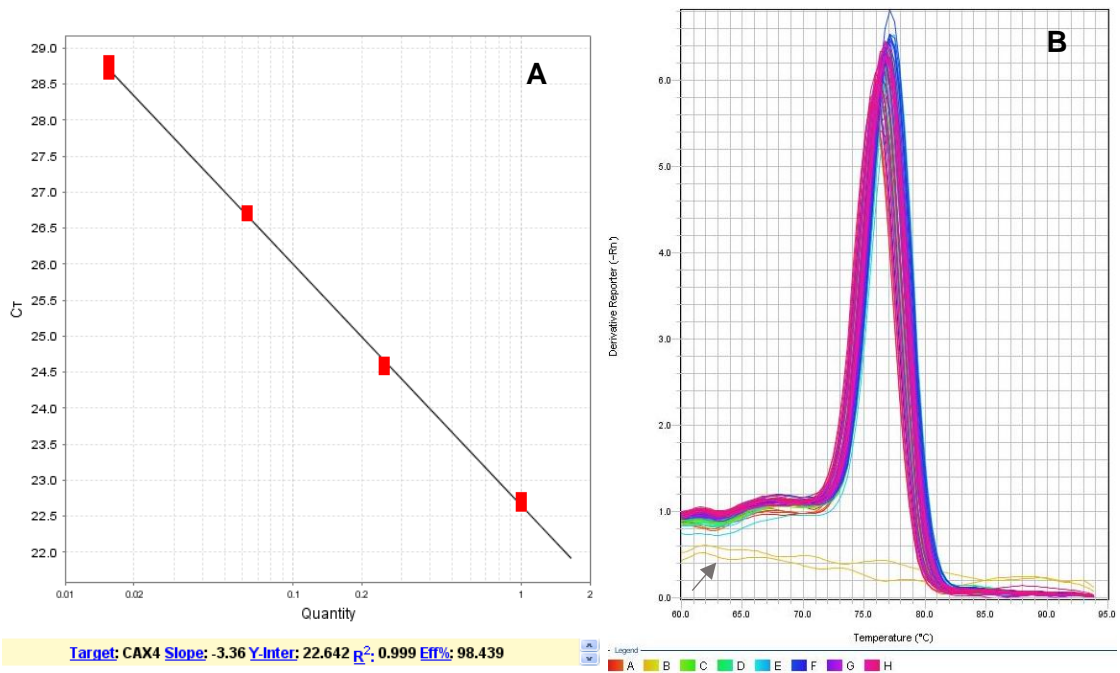
**Figura 1.** (A) Retra padrão do gene *V-ATPase* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.



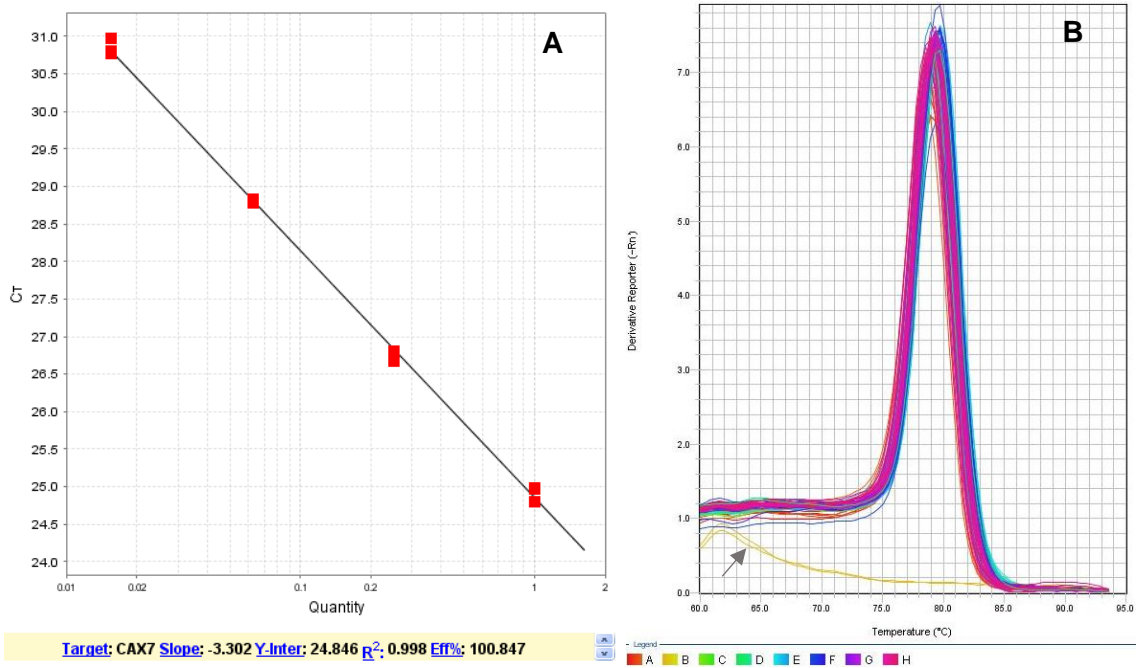
**Figura 2.** (A) Retra padrão do gene *PPase* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.



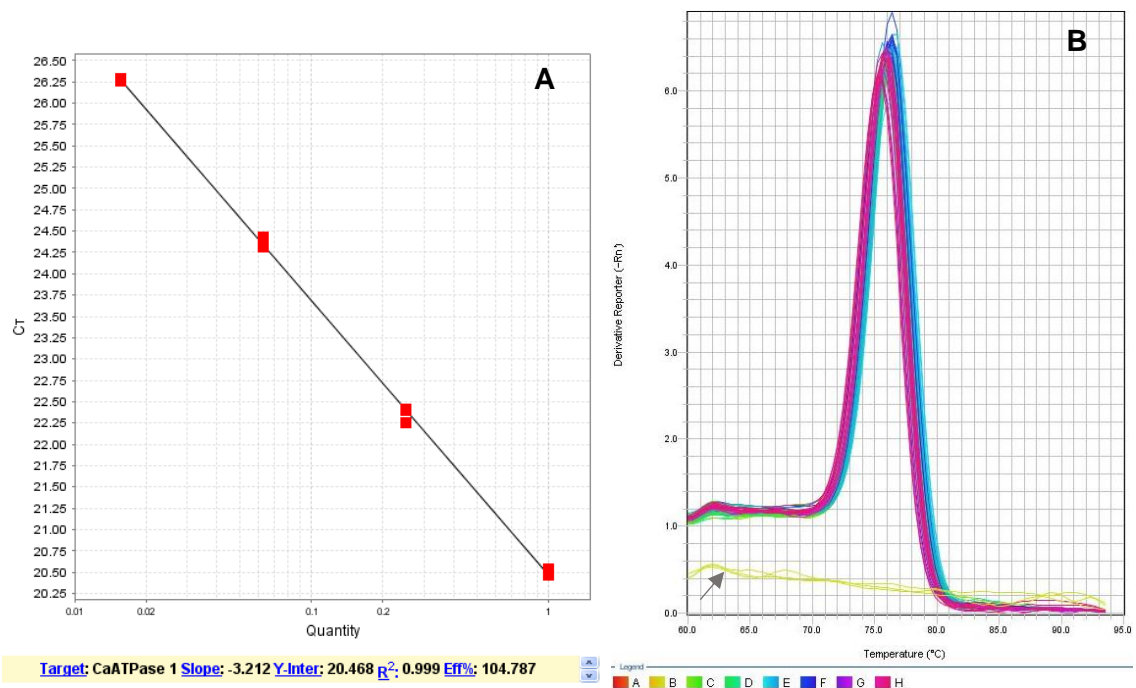
**Figura 3.** (A) Retra padrão do gene CAX3 contendo o declive (slope), coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.



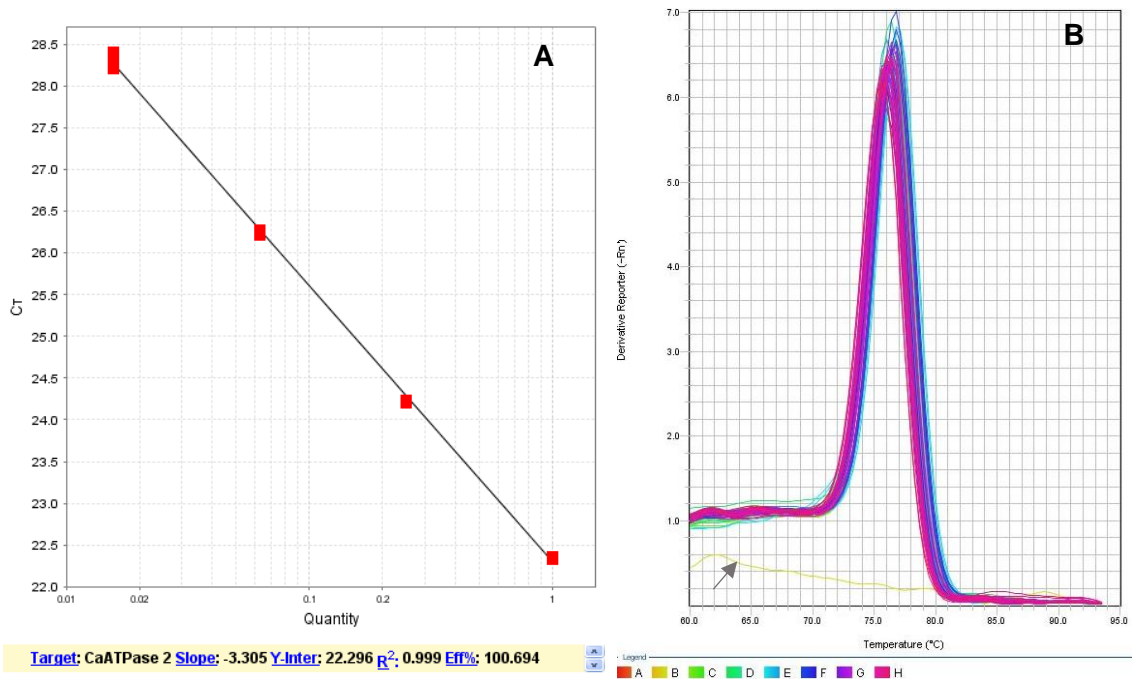
**Figura 4.** (A) Retra padrão do gene CAX5 contendo o declive (slope), coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt.



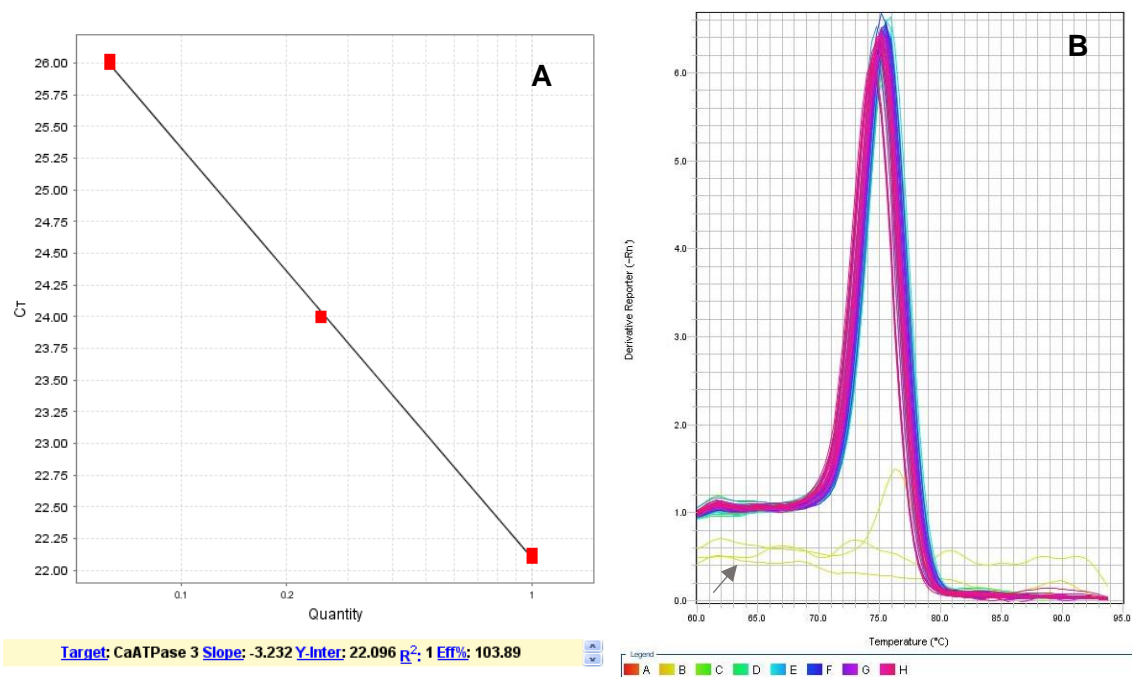
**Figura 5.** (A) Retra padrão do gene CAX6 contendo o declive (slope), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.



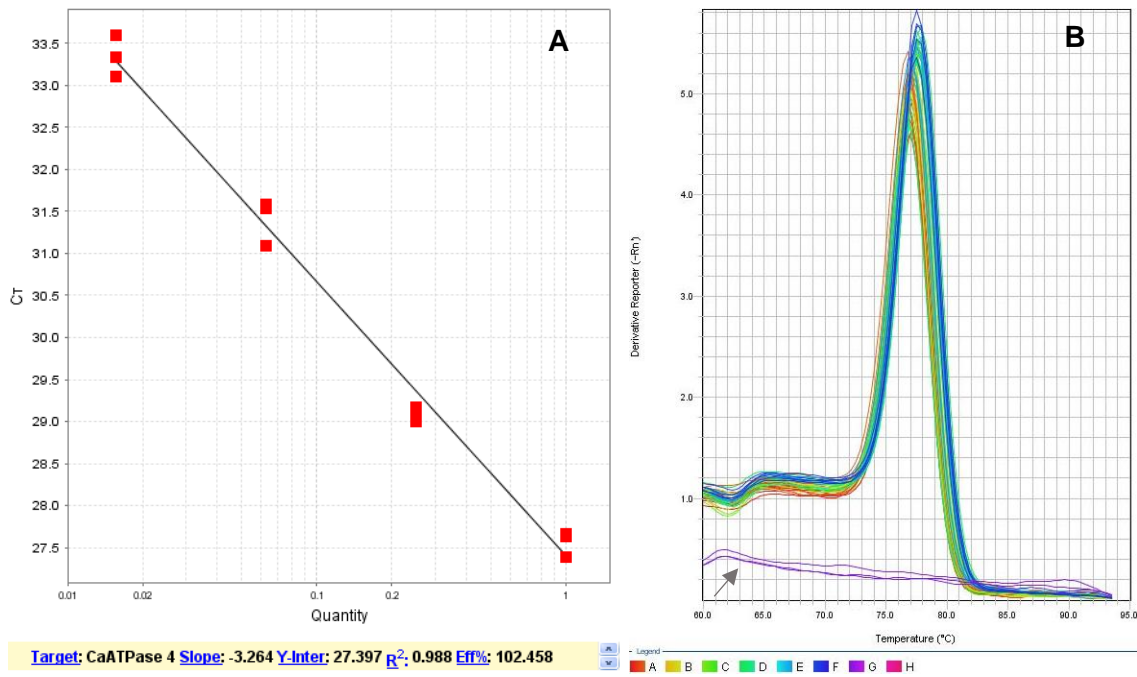
**Figura 6.** (A) Retra padrão do gene *CaATPase1* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.



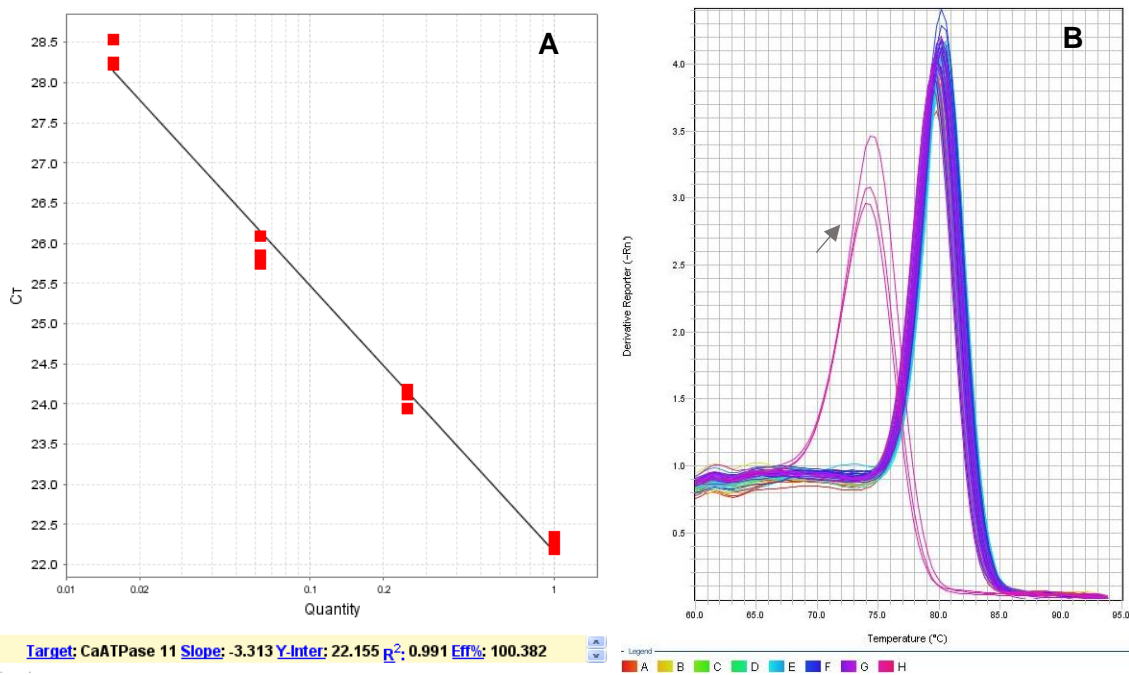
**Figura 7.** Retra padrão do gene *CaATPase2* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência (E%) e a curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.



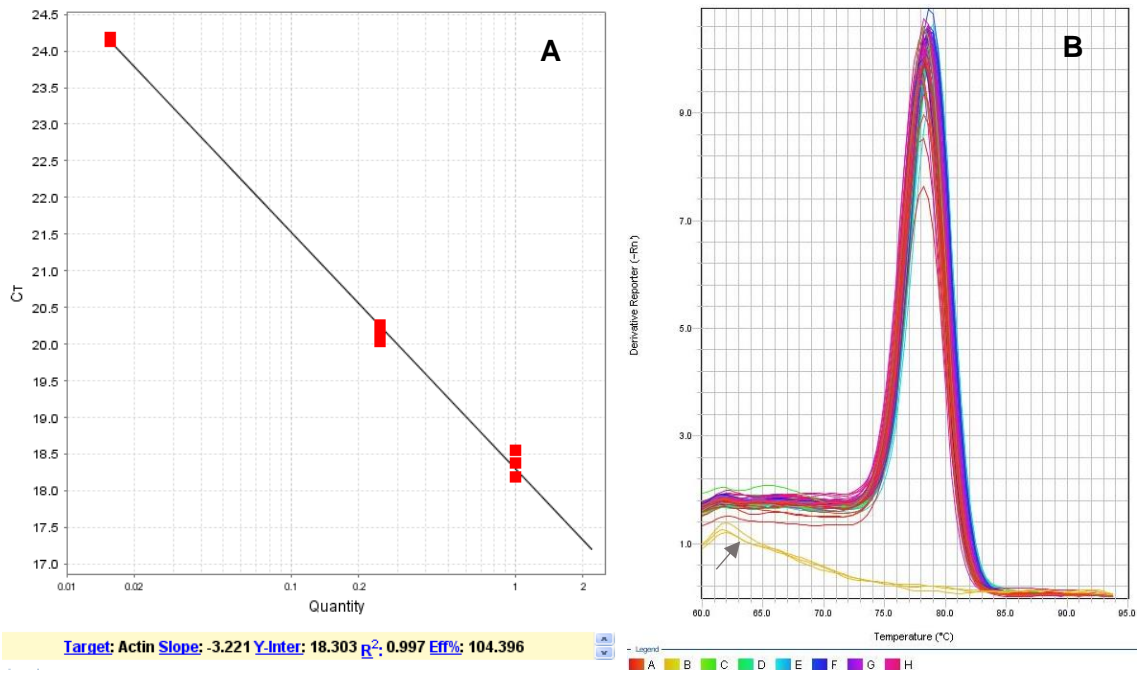
**Figura 8.** (A) Retra padrão do gene *CaATPase3* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.



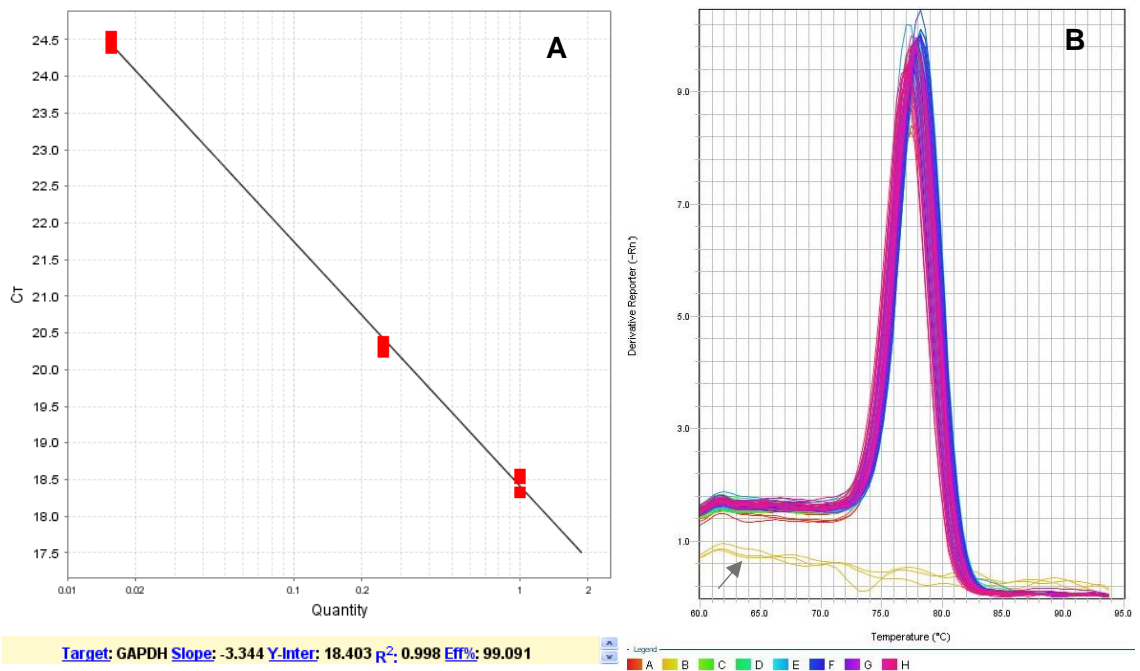
**Figura 9.** (A) Retra padrão do gene *CaATPase4* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.



**Figura 10.** (A) Retra padrão do gene *CaATPase11* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.

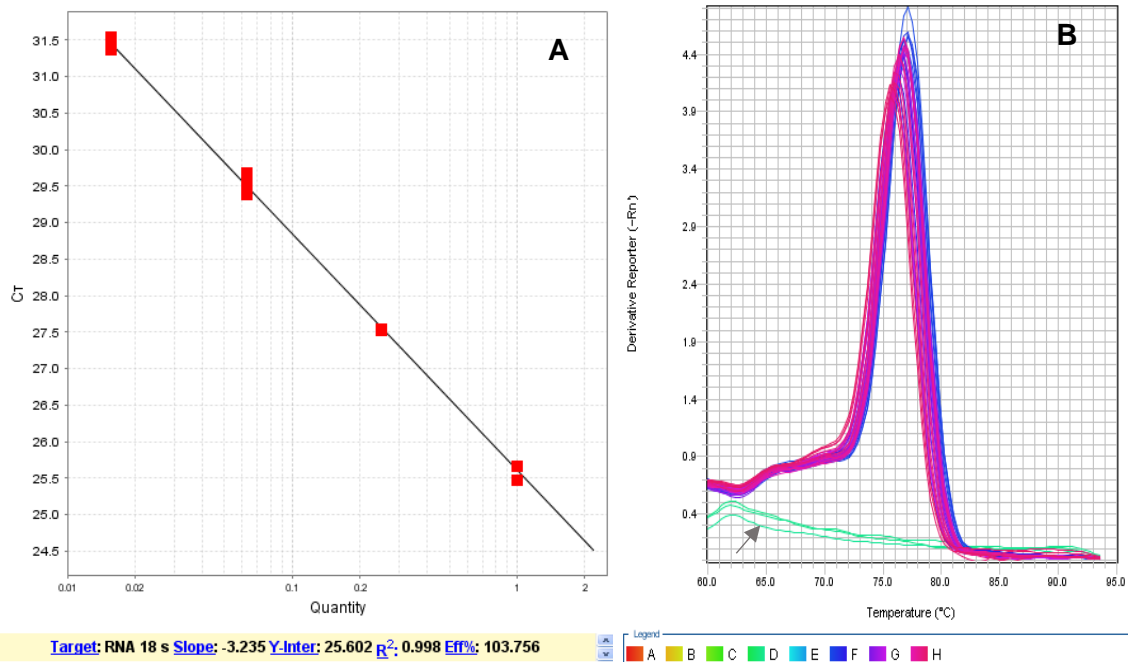


**Figura 11.** (A) Retra padrão do gene de referência *Actin* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.

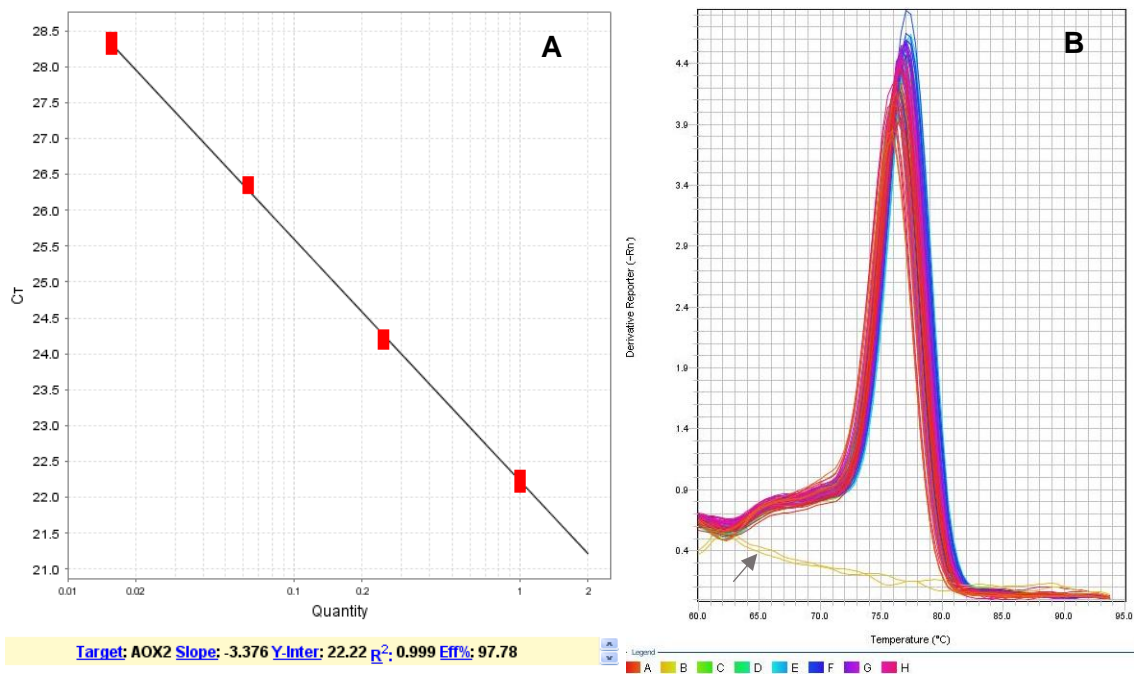


**Figura 12.** (A) Retra padrão do gene de referência *GAPDH* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.





**Figura 13.** (A) Retra padrão do gene de referência *18sRNA* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.



**Figura 14.** (A) Retra padrão do gene de referência *AOX2* contendo o declive (slope), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a eficiência (E%). (B) Curva de Melt - a seta indica a curva dos controlos negativos.

**Tabela 1.** Matriz de correlação para as características físico-químicas dos morangos cv. 'Portola' em função de 1 aplicação das concentrações (0, 1 e 4%) de CaCl<sub>2</sub>.

		Firmeza	L*	h <sup>o</sup>	C*	SST	AT	pH	SST/AT	Ca Fruto	Ca AIR
Firmeza	Controlo	1									
	1% CaCl <sub>2</sub>	1									
	4% CaCl <sub>2</sub>	1									
L*	Controlo	ns	1								
	1% CaCl <sub>2</sub>	<b>-0,21**</b>	1								
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	1								
h <sup>o</sup>	Controlo	ns	<b>0,88**</b>	1							
	1% CaCl <sub>2</sub>	<b>-0,19*</b>	<b>0,89**</b>	1							
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	<b>0,82**</b>	1							
C*	Controlo	ns	<b>0,27**</b>	ns	1						
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	<b>0,34**</b>	<b>0,22**</b>	1						
	4% CaCl <sub>2</sub>	<b>-0,18*</b>	<b>0,26**</b>	ns	1						
SST	Controlo	ns	ns	ns	ns	1					
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	1					
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	1					
AT	Controlo	ns	ns	ns	ns	<b>0,70**</b>	1				
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	<b>0,80*</b>	1				
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	<b>-0,64*</b>	ns	ns	<b>0,69**</b>	1				
pH	Controlo	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1			
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	<b>-0,70**</b>	<b>-0,80*</b>	1			
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	<b>0,65*</b>	ns	ns	ns	ns	1			
SST/AT	Controlo	ns	ns	<b>-0,56*</b>	ns	<b>0,83**</b>	ns	ns	1		
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	<b>-0,61*</b>	<b>0,81**</b>	ns	ns	1		
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	<b>0,60*</b>	ns	ns	1		
Ca Fruto	Controlo	ns	ns	ns	ns	ns	<b>0,81*</b>	ns	ns	1	
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1	
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1	
Ca AIR	Controlo	ns	ns	ns	ns	<b>0,89*</b>	ns	ns	<b>0,89*</b>	ns	1
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<b>-0,87*</b>	ns	1
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	<b>-0,84*</b>	<b>0,98**</b>	ns	ns	1

ns - não significativo;

\* - significância entre parâmetros com  $P \leq 0,05$ .\*\* - significância entre parâmetros com  $P \leq 0,01$ .

**Tabela 2.** Matriz de correlação para as característica físico-químicas dos morangos cv. 'Portola' em função de 2 aplicações das concentrações (0, 1 e 4%) de CaCl<sub>2</sub>.

		Firmeza	L*	h°	C*	SST	AT	pH	SST/AT	Ca Fruto	Ca AIR
<b>Firmeza</b>	Controlo	1									
	1% CaCl <sub>2</sub>	1									
	4% CaCl <sub>2</sub>	1									
<b>L*</b>	Controlo	ns	1								
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	1								
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	1								
<b>h°</b>	Controlo	ns	<b>0,79**</b>	1							
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	<b>0,81**</b>	1							
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	<b>0,78**</b>	1							
<b>C*</b>	Controlo	ns	<b>0,41**</b>	<b>0,20*</b>	1						
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	<b>0,40**</b>	<b>0,22**</b>	1						
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	<b>0,38**</b>	ns	1						
<b>SST</b>	Controlo	ns	ns	ns	ns	1					
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	1					
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	<b>-0,57*</b>	ns	1					
<b>AT</b>	Controlo	ns	ns	ns	ns	ns	1				
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	<b>0,76**</b>	1				
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	<b>0,75**</b>	1				
<b>pH</b>	Controlo	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1			
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1			
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	<b>-0,58*</b>	<b>-0,84**</b>	1			
<b>SST/AT</b>	Controlo	ns	ns	ns	ns	<b>0,90*</b>	ns	<b>0,65*</b>	1		
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1		
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1		
<b>Ca Fruto</b>	Controlo	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<b>0,95**</b>	<b>0,812*</b>	1	
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1	
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<b>-0,93**</b>	1	
<b>Ca AIR</b>	Controlo	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1
	1% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1
	4% CaCl <sub>2</sub>	ns	ns	ns	<b>-0,77*</b>	ns	ns	ns	ns	ns	1

ns - não significativo;

\* - significância entre parâmetros com  $P \leq 0,05$ .

\*\* - significância entre parâmetros com  $P \leq 0,01$ .





**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**  
INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO  
E FORMAÇÃO AVANÇADA

---

**Contactos:**

Universidade de Évora

**Instituto de Investigação e Formação Avançada - IIFA**

Palácio do Vimioso | Largo Marquês de Marialva, Apart. 94

7002-554 Évora | Portugal

Tel: (+351) 266 706 581