



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Tércia Maria Rodrigues Lopes

AVALIAÇÃO, MICROPROPAGAÇÃO E SELEÇÃO  
DE PLANTAS DE TAMARILHO (*SOLANUM BETACEUM* CAV.)

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal,  
orientada pela Doutora Sandra Isabel Marques Correia  
e Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto  
e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019



*À minha família.*

“But you know... Happiness can be found,  
even in the darkest of times,  
if one only remembers to turn on the light.”

J. K. Rowling



Project “RENATURE- Valorization of the Natural Endogenous Resources of the Centro Region” (CENTRO-01-0145-FEDER-000007). Funded by the Comissão de Coordenação da Região Centro (CCDR-C) and subsidized by the European Regional Development Found (FEDER).

Projeto PTDC/BAA-AGR/32265/2017: “Tamarillo breeding: better plants for better products”. (projeto nº 032265 no âmbito do Aviso de concurso nº 02/SAICT/2017).





## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Doutor Jorge Canhoto pela orientação, apoio e tempo dispendido para ajudar nos desafios inerentes a esta fase do mestrado. À Doutora Sandra Correia, a quem, além da orientação, agradeço pela disponibilidade e ajuda incansável, sem a qual, de certeza, não chegaria aqui.

Agradeço também ao Daniel Martín pela ajuda fundamental, disponibilidade e simpatia.

Deixo também um obrigada a todas as pessoas que mantêm o LBV em funcionamento, sem as quais não teria sido possível.

Quero agradecer à Mariana, Jéssica e Bruno por se tornarem nalgém que eu não esperava vir a necessitar na minha vida. Agradecer pela aventura em que nos tornámos, a equipa que somos e a aventura Legutê que fomos, por cada pinga de suor, raiva e amor que demos a cada um e a todos nós. Por cada luta que travámos. Pela graça que fomos, somos e seremos. Não de ontem, mas de hoje em diante. Agradeço também à Team Tamarilho (Mariana, Patrícia, Joana e Miguel) a quem estarei eternamente grata pela ajuda. A todo este grupo dediquei sorrisos, risos, desafios, suor, palhaçadas, finos, canecas, sangrias, mandarins e lágrimas, e certamente levar-vos-ei comigo, para a vida.

Não posso deixar de agradecer à Alexandra, Bárbara, Inês, Fábio e Márcia, sem quem certamente não teria forças para chegar ao final da corrida.

Por último, deixo um agradecimento à minha família, em especial aos meus pais e irmão, que me são tudo, pelo amor, carinho e chatices que fazem parte, e aos que, por força estão longe, nunca estão distantes. Um sincero, e eterno, obrigado.





## Índice

Abstract.....	xxi
Resumo .....	xxiii
1. Introdução .....	1
1.1. Considerações iniciais .....	1
1.2. Tamarilho ( <i>Solanum betaceum</i> Cav.).....	2
1.2.1. Classificação científica e distribuição .....	2
1.2.2. Importância económica.....	2
1.2.3. Descrição botânica e morfológica .....	3
1.2.4. Variedades de tamarilho .....	5
1.2.5. Composição nutricional.....	5
1.2.6. Propagação e produção do tamarilho.....	6
1.2.7. Colheita e pós-colheita .....	10
1.2.8. Seleção e melhoramento .....	11
1.3. Micropropagação.....	14
1.4. Técnicas de análise na seleção de genótipos de interesse.....	14
1.4.1. Espectroscopia ATR-FTIR e de Raman .....	16
1.4. Objetivos .....	17
2. Materiais e Métodos.....	19
2.1. Material Vegetal .....	19
2.2. Avaliação do potencial de micropropagação das linhas de tamarilho .....	21
2.2.1. Germinação de sementes e estabelecimento <i>in vitro</i> de plantas de tamarilho .....	21
2.2.2. Avaliação das taxas de multiplicação, enraizamento e sobrevivência de plantas com diferentes origens .....	22
2.2.3. Avaliação de parâmetros fisiológicos e morfológicos .....	26
2.3. Avaliação da qualidade dos frutos .....	29
2.3.1. Parâmetros biométricos e análise sensorial .....	29

2.3.2. Parâmetros físico-químicos.....	30
2.3.4. Análise química (FTIR e Raman).....	30
2.4. Análise estatística .....	31
3. Resultados e Discussão .....	33
3.1. Germinação de sementes e estabelecimento <i>in vitro</i> de plantas de tamarilho ...	33
3.2. Avaliação das taxas de multiplicação, enraizamento e sobrevivência de plantas de diferentes origens.....	33
3.2.1. Enraizamento .....	38
3.2.2. Aclimatização .....	44
3.3. Avaliação da qualidade dos frutos .....	50
3.3.1. Parâmetros biométricos, físico-químicos e análise sensorial .....	50
3.3.2. Análise química (ATR-FTIR e Raman) .....	57
4. Conclusões e perspectivas futuras .....	73
5. Referências.....	75

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Origem e distribuição do tamarilho ( <i>Solanum betaceum</i> Cav.). .....	2
<b>Figura 2</b> – Exemplos de aplicações do tamarilho. A) Tamarilho em fresco. B) Livro de receitas de tamarilho (Bilton, 2009). C) Doce de tamarilho. D) Chutney de tamarilho (Smith and Caughey's, 2019). E) Licor de tamarilho (Casa de Encosturas, 2017). F) Poncha de tamarilho.....	3
<b>Figura 3</b> – <i>Solanum betaceum</i> Cav. A) Árvore de tamarilho da Mealhada (TVM). B) Flores em diferentes estados de desenvolvimento. C) Frutos. D) Fruto cortado transversalmente onde são visíveis as sementes. ....	4
<b>Figura 4</b> – <i>Solanum betaceum</i> Cav. A) Tamarilhos maduros na altura da colheita. B) Tamarilhos embalados.....	11
<b>Figura 5</b> – Micropropagação – proliferação por gomos axilares. A) Tipos de explantes (Raj, 2018). B) Etapas da micropropagação. ....	15
<b>Figura 6</b> – Locais de recolha dos frutos de tamarilho em Portugal continental e na ilha da Madeira para análise e caracterização. Indicação dos 5 locais de recolha na região de Coimbra e 3 locais de recolha na vertente norte da ilha da Madeira. ....	19
<b>Figura 7</b> – Árvores de tamarilho. A) Exemplar do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. B) Exemplar da Mealhada. C) Exemplar da Madeira. ....	20
<b>Figura 8</b> – Germinação de sementes em tubos de ensaio e placas de Petri no escuro... ..	22
<b>Figura 9</b> – Avaliação das taxas de multiplicação, enraizamento e sobrevivência de plantas com diferentes origens. A) Linhas clonais estabelecidas a partir de germinantes (2018). B) Avaliação da propagação. C) Enraizamento in vitro. D) Enraizamento ex vitro e aclimatização. E) Transferência das plantas para tubetes (capacidade de 1L). F) Plantas na estufa exterior.....	25
<b>Figura 10</b> – Avaliação de parâmetros fisiológicos e morfológicos. A) Fluorómetro portátil Mini-PAM (Waltz Effeitrich germany). B) Medição do rendimento máximo da fluorescência máxima do fotossistema II. C) Avaliação do crescimento. D), E) e F) Medição do potencial hídrico ( $\psi_w$ ).....	26
<b>Figura 11</b> – Esquema ilustrativo da avaliação das taxas de propagação, enraizamento e sobrevivência e de parâmetros fisiológicos e morfológicos de plantas com diferentes origens. ....	28

**Figura 12** – Avaliação da qualidade dos frutos – Parâmetros biométricos e análise sensorial. A) Diâmetro do fruto. B) Comprimento do fruto. C) Diâmetro do pedúnculo. D) Firmeza do fruto. .... 29

**Figura 13** – Avaliação da qualidade dos frutos – Parâmetros físico-químicos. A) Medição do conteúdo de sólidos solúveis. B) Fruto processado (pré-centrifugação). C) Solução trifásica (pós-centrifugação). D) Medição da acidez..... 30

**Figura 14** – Micropropagação de gomos axilares ao longo de duas subculturas das linhas estabelecidas em 2014. .... 34

**Figura 15** – Avaliação da propagação ao longo de duas subculturas. A) Taxas de multiplicação dos rebentos – Linhas estabelecidas 2014. B) Taxas de multiplicação dos rebentos – Linhas estabelecidas 2018. C) Diâmetro do calo – Linhas estabelecidas 2014. D) Diâmetro do calo – Linhas estabelecidas 2018. E) Altura dos rebentos – Linhas estabelecidas 2014. F) Altura dos rebentos – Linhas estabelecidas 2018. G) Número de nós – Linhas estabelecidas 2014. H) Número de nós – Linhas estabelecidas 2018. Nos gráficos das imagens B), D), F) e H), os dados encontram-se agrupados pela variedade de tamarilho: vermelhos vs laranjas. Valores apresentados como média  $\pm$  DP ( $1 \leq n \leq 6$ ). Os valores indicados com letras diferentes, no mesmo gráfico, são significativamente diferentes pelo teste ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ). Quando não é apresentado o desvio-padrão, deve-se ao facto de haver apenas uma amostra. .... 37

**Figura 16** – Rebentos em enraizamento. A) Enraizamento in vitro. B) e C) Enraizamento ex vitro e aclimatização simultânea. .... 39

**Figura 17** – Plântulas onde são visíveis as raízes desenvolvidas após os diferentes ensaios de enraizamento. A) Enraizamento in vitro. B) Enraizamento ex vitro sem IBA. C) Enraizamento ex vitro com IBA..... 39

**Figura 18** – Avaliação do enraizamento de rebentos das linhas estabelecidas em 2014 versus linhas estabelecidas em 2018. Apenas para as linhas estabelecidas em 2018 foram analisados os parâmetros relativos ao enraizamento in vitro versus ex vitro sem IBA versus ex vitro com IBA, para tamarilhos de linhas laranjas versus vermelhos. A) e B) Taxas de enraizamento. C) e D) Altura das plantas. E) e F) Biomassa da parte aérea. Valores apresentados como média  $\pm$  DP ( $1 \leq n \leq 6$ ). Os valores indicados com letras diferentes, no mesmo gráfico, são significativamente diferentes pelo teste t (lado esquerdo) e ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ) (lado direito). Quando não é apresentado o desvio-padrão, deve-se ao facto de haver apenas uma amostra. .... 40

**Figura 19** – Avaliação do enraizamento (Continuação da figura 18). Avaliação do enraizamento de rebentos das linhas estabelecidas em 2014 versus linhas estabelecidas em 2018. Apenas para as linhas estabelecidas em 2018 foram analisados os parâmetros relativos ao enraizamento in vitro versus ex vitro sem IBA versus ex vitro com IBA, para tamarilhos de linhas laranjas versus vermelhos. G) e H) Biomassa raízes. I) e J) Comprimento da raiz principal. K) e L) Número de raízes secundárias. Valores apresentados como média ± DP ( $1 \leq n \leq 6$ ). Os valores indicados com letras diferentes, no mesmo gráfico, são significativamente diferentes pelo teste t (lado esquerdo) e ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ) (lado direito). Quando não é apresentado o desvio-padrão, deve-se ao facto de haver apenas uma amostra. 41

**Figura 20** – Aclimatização das plantas cujo enraizamento foi realizado in vitro. A) Plântulas no início da aclimatização. B) Plantas no final da aclimatização..... 44

**Figura 21** – Plantas sobreviventes à aclimatização: medição da fluorescência, potencial hídrico e biomassas (parte aérea e raízes). A) Plantas provenientes do enraizamento in vitro. B) Plantas provenientes do enraizamento ex vitro sem IBA. C) Plantas provenientes do enraizamento ex vitro com IBA. .... 44

**Figura 22** – Taxas de sobrevivência. A) Plântulas obtidas de enraizamento in vitro: linhas estabelecidas 2014 versus linhas estabelecidas 2018. B) Plântulas obtidas de enraizamento in vitro versus ex vitro sem IBA vs ex vitro com IBA das linhas estabelecidas 2018. Valores apresentados como média ± DP ( $4 \leq n \leq 6$ ). Foi realizado o teste ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ). Quando não são apresentadas letras é indicativo de que não há diferenças significativas..... 45

**Figura 23** – Raízes de plantas de diferentes variedades, provenientes de enraizamentos diferentes. Linha superior – variedade laranja. A) In vitro. B) Ex vitro sem IBA C) Ex vitro com IBA. Linha inferior – variedade vermelha. D) In vitro. E) Ex vitro sem IBA. F) Ex vitro com IBA. .... 47

**Figura 24** – Avaliação do desenvolvimento entre plantas sobreviventes de tamarilho laranjas versus vermelhos obtidos de três tipos de enraizamento: in vitro versus ex vitro sem IBA versus ex vitro com IBA. A) Rendimento máximo de fluorescência da clorofila a do fotossistema II. B) Eficiência fotoquímica do fotossistema II. C) Potencial hídrico. D) Comprimento da parte aérea. E) Biomassa das raízes. F) Biomassa da parte aérea. Valores apresentados como média ± DP ( $4 \leq n \leq 6$ ). Os valores indicados com letras diferentes, no mesmo gráfico, são significativamente diferentes pelo teste ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ). Quando não são apresentadas letras é indicativo de que não há diferenças significativas. .... 49

**Figura 25** – Avaliação da qualidade dos frutos – recolha durante o amadurecimento. Parâmetros biométricos: A) Diâmetro do fruto. B) Comprimento do fruto. C) Diâmetro do pedúnculo. D) Peso do fruto. Análise sensorial: E) Firmeza do fruto. Parâmetros físico-químicos: F) Conteúdo de sólidos solúveis. G) Acidez. Os frutos considerados para o estudo eram das árvores do Jardim Botânico: TJB 0 – Vermelho; TJB 1 – Vermelho; TJB 3 – Vermelho; TJB 5 – Laranja; e da Figueira da Foz: TFF – Vermelho. .... 52

**Figura 26** – Gradação de cor do exocarpo durante a maturação dos tamarilhos, ao longo das cinco recolhas. A) Tamarilhos vermelhos. B) Tamarilhos laranjas. .... 53

**Figura 27** – Maturação do tamarilho. Alterações no exterior e interior do tamarilho – tubo de ensaio com solução trifásica após centrifugação. A) Tamarilho vermelho. B) Tamarilho laranja. .... 54

**Figura 28** – Avaliação da qualidade dos frutos – recolha no estado maduro. Parâmetros biométricos: A) Diâmetro do Fruto. B) Comprimento do fruto. C) Diâmetro do pedúnculo. D) Peso do fruto. Análise sensorial: E) Firmeza do fruto. Parâmetros físico-químicos: F) Conteúdo de sólidos solúveis. G) Acidez. Os dados encontram-se ordenados por localidades: Madeira, Sargento-Mor, Mealhada, Jardim Botânico (Universidade de Coimbra) e Figueira da Foz, e agrupados pela variedade de tamarilho: amarelo vs laranja vs vermelho. Valores apresentados como média  $\pm$  DP ( $5 \leq n \leq 7$ ). Os valores indicados com letras diferentes, no mesmo gráfico, são significativamente diferentes pelo teste ANOVA de uma via ( $p < 0,05$ ). 57

**Figura 29** – Espectros ATR-FTIR de cada fruto: A) TVM – Tamarilho Vermelho da Mealhada. B) TMI – Tamarilho Madeira Importado; C) e D) TJB – Tamarilho Jardim Botânico Universidade de Coimbra: 1 – Vermelho; 5 – Laranja. EpEx – Epicarpo Externo; EpIn – Epicarpo Interno; Mes – Mesocarpo; S – Semente. Para maior clareza, alguns espectros foram deslocados em relação aos outros. .... 62

**Figura 30** – Espectros ATR-FTIR e cada região do fruto: A) Epicarpo Externo. B) Epicarpo Interno. C) Mesocarpo. D) S – Semente. TVM – Tamarilho Vermelho da Mealhada. TMI – Tamarilho Madeira Importado. TJB – Tamarilho Jardim Botânico Universidade de Coimbra: 1 – Vermelho; 5 – Laranja. Para maior clareza, alguns espectros foram deslocados em relação aos outros. .... 64

**Figura 31** – Espectros Raman de cada fruto: A) TVM – Tamarilho Vermelho da Mealhada. B) TMI – Tamarilho Madeira Importado; C) e D) TJB – Tamarilho Jardim Botânico Universidade de Coimbra: 1 – Vermelho; 5 – Laranja. EpEx – Epicarpo Externo; EpIn – Epicarpo Interno; Mes – Mesocarpo: Mes1 – carotenoides; Mes2 - polifenóis; S –

Semente. \*B) Mes. – Mesocarpo: carotenoides. C) Mes. – Mesocarpo: polifenóis. Para maior clareza, alguns espectros foram deslocados em relação aos outros. .... 69

**Figura 32** – Espectros Raman das sementes dos frutos – TVM, TMI, TJB 1 e 5 – e Ácido Linoleico (AL)..... 70





## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Caracterização das diferentes variedades de tamarilho conhecidas (amarelo, vermelho, roxo e laranja). .....	6
<b>Tabela 2</b> – Composição nutricional dos frutos de tamarilho (Chacón, 2014; Prohens e Nuez, 2001; Schotsmans 2011). .....	7
<b>Tabela 3</b> – Pragas e doenças da árvore do tamarilho (Chacón, 2014). .....	12
<b>Tabela 4</b> – Parâmetros das retas de calibração de regressão linear com os valores de $r^2$ , a 532 nm (Jamison et al., 2018). .....	17
<b>Tabela 5</b> – Identificação das árvores utilizadas para recolhas dos frutos analisados, com indicação da sua localização e do estado de amadurecimento com que os frutos foram colhidos (durante o amadurecimento, entre Outubro e Dezembro de 2018, em transição de coloração verde para vermelho ou laranja, ou já maduros, em Dezembro de 2018, com coloração totalmente vermelha ou laranja). .....	20
<b>Tabela 6</b> – Identificação das linhas de plantas micropropagadas. ....	21
<b>Tabela 7</b> – Taxas de germinação das 19 sementes (12 em placas; 9 em tubos de ensaio) dos frutos das árvores do Jardim Botânico.....	33
<b>Tabela 8</b> – Taxas de multiplicação (após 2 subculturas), enraizamento e sobrevivência das plantas obtidas a partir das linhas clonais estabelecidas in vitro em 2014 e em 2018. Apenas para as linhas estabelecidas in vitro em 2018 foram calculadas taxas de enraizamento e sobrevivência de plantas enraizadas em 3 condições - in vitro versus ex vitro sem IBA versus ex vitro com IBA 0,5 mg/L). .....	35
<b>Tabela 9</b> – Comprimentos de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) de espectroscopia FTIR-ATR e atribuições provisórias para os tamarilhos TVM, TMI, TJB 1 e TJB 5. ....	59
<b>Tabela 10</b> – Comprimentos de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) de espectroscopia de Raman e atribuições provisórias para os tamarilhos TVM, TMI, TJB 1 e TJB 5. ....	66
<b>Tabela 11</b> – Parâmetros das retas de calibração de regressão linear com os valores de $r^2$ , a 532 nm (Jamison et al., 2018). .....	70
<b>Tabela 12</b> – Rácios de intensidade semi-quantitativos dos espectros Raman das sementes do tamarilho (TVM, TMI, TJB 1, TJB5) comparadas com o ácido linoleico (AL). 71	



## Lista de abreviaturas

AL – Ácido Linoleico	IR – Infra Red
asym – assimétrico	KOH – Hidróxido de Potássio
ATR-FTIR – Attenuated Total Reflectance -Fourier Transform Infra-Red	Mes. – Mesocarpo
BAP – 6-benzilaminopurina	MS – Murashige and Skoog (1962)
CMV – Vírus do mosaico do pepino	NUC – Neglected or Underutilized Crop
CSS – Conteúdo de Sólidos Solúveis	PGR – Plant Growth Regulator
DM – Dry Matter	PS – Peso Seco
DP – Desvio-Padrão	PSII – Photosystem II
DW – Dry Weight	PVY – Vírus Y da batata
E.E. – Epicarpo Externo	rpm – rotação por minuto
E.I. – Epicarpo Interno	RSS – Resonance Raman spectroscopy
FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power	S. – Semente
FTIR - Fourier Transform Infra-Red	sym – simétrico
FW – Fresh Weight	TaMV – Vírus do mosaico do tamarilho
GAE – Gallic Acid Equivalents	TROLOX – 6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid
HCl – Ácido Clorídrico	UE - União europeia
IBA – Ácido 3-Indolbutírico	$\delta$ - ligação bending
IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera	$\nu$ - ligação stretch



## Abstract

Tamarillo is a small tree of the Solanaceae family, native to the Andean region of South America. Due to a growing demand for this fruit, the main purpose of this work was the evaluation, micropropagation and selection of tamarillo plants with potential to the Portuguese agro-food sector. Plant propagation potential was assessed in lines of both red and orange varieties. The possible influence of establishment age in propagation capacity (multiplication, rooting and survival) was evaluated using long-term established (2014) and recently established (2018) (red and orange) lines. Two types of fruit quality evaluation were realized: throughout the maturation for 3 months (5 harvests,  $\Delta t = 3$  weeks); when the fruit was totally ripe. Fruit (varieties orange and red) harvest took place in several locations: Mealhada, Sargento-Mor, Botanical Garden of University of Coimbra and Figueira da Foz (Continental Portugal) and Madeira island.

Plant propagation potential was assessed through several parameters such as axillary shoot proliferation and rooting length and biomass; survival rate after the hardening process, and physiology of successfully acclimatized plantlets (60 days after plants transference to exterior greenhouse). Based on multiplication rates it was possible to conclude that long-term established ( $> 5$  years) genotypes had significantly lower multiplication rates (33.0 – 75.0 %) when compared to recently established genotypes ( $< 1$  year), with rates of 80.0 – 94.0 %. *Ex vitro* rooting of the multiplied shoots was very effective (with IBA 0.5 mg/L – 79.50 % and without IBA – 81.14 %) although less effective than *in vitro* rooting (92.58 %). The length and number of the roots obtained *ex vitro* were higher and with higher biomasses (with IBA – 15 cm, 8 roots, 7.63 % DW; without IBA – 13 cm, 8 roots, 8.49 % DW; *in vitro* rooting – 4 cm, 5 roots, 7.31 % DW; respectively). The different rooting processes didn't interfere in the survival rate after hardening. The orange tamarillo leaves showed a lower maximum chlorophyll *a* fluorescence due to its leaves being light green. However, it appears that orange tamarillos presented better adaptation to unfavourable conditions felted in exterior greenhouse.

Fruit characterization was made using different approaches such as morphological (hardness and biometric values), physical-chemical (acidity and soluble solid content) and chemical (ATR-FTIR and Raman spectroscopy data) parameters, collected from red and orange fruits from different provenances. The results obtained showed that red fruits have higher hardness and soluble solid content in comparison with the orange ones that are poorer

in acidity. Red fruit varieties are greater in fruit size, which make them more attractive for fresh consumption. The yellow fruits do not appear to be of high quality since they are small and highly acidic. Confocal Raman microscopy was also employed to analyze the fruits. Raman spectra showed that, depending on the focus and deepness of the focus, is presented a highly noteworthy a different profile for the same sample. The main striking changes were found within the different zones of the fruit (external epicarp, internal epicarp, mesocarp and seed) analyzed and not with the provenance regions. In TVM (red) and TJB 5 (orange) fruits, two epicarp profiles were obtained: one of them is the typical skin profile (polyphenols), and the other is easy to assign the carotenoids signals because of the resonant effect of the excitation wavelength. Considering all the results the following fruits seem to be more promising: TMI (Madeira), TVM 28 (Mealhada), TJB 12 (Botanical Garden UC) and TFF (Figueira da Foz).

Based on the fruit quality parameters analysed and on the multiplication potentials assessed, several genotypes of red and orange fruit varieties will be selected and made available for tamarillo fruit producers in Portugal.

**Keywords:** axillary shoot proliferation; *ex vitro* rooting; fruit quality; micropropagation yield

## Resumo

O tamarilho é uma pequena árvore da família Solanaceae, nativo da região dos Andes na América do Sul. Devido à crescente procura deste fruto, os principais objetivos deste trabalho foram a avaliação, micropropagação e seleção de plantas com potencial para o sector agroalimentar português. O potencial de propagação foi avaliado em linhas de tamarilho laranja e vermelho. A possível influência da idade de estabelecimento na capacidade de propagação (multiplicação, enraizamento e sobrevivência) foi avaliada entre linhas estabelecidas em 2018 e linhas que se encontram em subcultura há 5 anos (desde 2014). Dois tipos de avaliação foram realizados nos frutos: durante o amadurecimento por 3 meses (5 colheitas,  $\Delta t = 3$  semanas); quando o fruto estava maduro, pronto a consumir. A colheita de frutos laranjas e vermelhos foi realizada em várias localidades: Mealhada, Sargento-Mor, Jardim Botânico da Universidade de Coimbra, Figueira da Foz e ilha da Madeira.

O potencial de propagação foi avaliado através de vários parâmetros tais como a proliferação de meristemas e biomassa e comprimento das raízes, as taxas de sobrevivência após aclimatização e a fisiologia das plantas aclimatizadas com sucesso (60 dias após transferência para a estufa exterior). Com base nas taxas de multiplicação, foi possível concluir que genótipos estabelecidos *in vitro* há mais tempo ( $> 5$  anos) apresentam estas taxas significativamente menores (33,00 % – 75,00 %) quando comparadas com genótipos estabelecidos mais recentemente ( $< 1$  ano; 80,00 % – 94,00 %). O enraizamento *ex vitro* foi eficaz (com IBA 0,5 mg/L – 79,50 %; sem IBA – 81,14 %), embora não tão tanto quanto o enraizamento *in vitro* (92,58 %). O comprimento e número de raízes obtidos no enraizamento *ex vitro* foram superiores e originaram uma biomassa superior (com IBA – 15 cm, 8 raízes, 7,31 % PS; sem IBA – 13 cm, 8 raízes, 8,49 % PS; *in vitro* – 4 cm, 5 raízes, 7,63 % PS; respetivamente). Os diferentes tipos de enraizamento não interferiram na sobrevivência após a aclimatização. As folhas do tamarilho laranja apresentaram menor fluorescência máxima da clorofila *a*, devido às folhas serem de um verde mais claro. Contudo, estes tamarilhos laranja apresentaram melhor adaptação às condições desfavoráveis de temperatura e humidade a que as plantas foram sujeitas na estufa exterior.

A caracterização da qualidade de frutos laranjas e vermelhos de diferentes proveniências foi determinada através de diferentes parâmetros morfológicos (valores biométricos e firmeza), físico-químicos (conteúdo de sólidos solúveis e acidez) e químicos (espectroscopia ATR-FTIR e Raman). Os resultados obtidos mostraram que os frutos

vermelhos possuem maior firmeza e conteúdo de sólidos solúveis em comparação com os laranja, que apresentam menor firmeza e acidez. Os frutos vermelhos são mais compridos, o que os torna mais apetecíveis para o consumo em fresco. Os amarelos não aparentam ter boa qualidade, uma vez que são pequenos e apresentam uma acidez elevada. Através de microscopia confocal de Raman verificou-se que, dependendo do foco e profundidade, pode obter-se um perfil altamente diferente na mesma amostra. As principais diferenças químicas foram encontradas dentro das diferentes regiões do fruto (epicarpo externo, epicarpo interno, mesocarpo e sementes) e não das diferentes proveniências de onde foram recolhidos. Nos frutos TVM (vermelho) e TJB 5 (laranja), foram obtidos dois perfis do epicarpo externo: enquanto que num foi observado o perfil típico do epicarpo (polifenóis), o outro possui sinais característicos de carotenoides (observáveis devido ao efeito ressoante do comprimento de onda). Considerando os resultados, os frutos TMI (Madeira), TVM 28 (Mealhada), TJB 12 (Jardim Botânico UC) e TFF (Figueira da Foz) são particularmente promissores.

Com base nos parâmetros de qualidade dos frutos e potenciais de multiplicação obtidos, vários genótipos de variedades de tamarilho laranja e vermelhos serão seccionais e colocados à disposição de produtores de Portugal.

**Palavras-chave:** enraizamento *ex vitro*; proliferação de gomos axilares; qualidade do fruto; rendimento de micropropagação.



## 1. Introdução

### 1.1. Considerações iniciais

Nos últimos anos o setor agroalimentar tem tido uma evolução apreciável no que diz respeito à procura de uma adaptação de diversos produtos ao gosto dos consumidores e procurando processá-los de forma mais saudável e com características inovadoras. Também a procura por novos frutos saudáveis é uma realidade nos mercados globais, com uma forte tendência para o aparecimento de culturas negligenciadas. Como resultado destas novas necessidades dos consumidores, surge o desafio de se trabalhar numa produção de alimentos mais saudáveis, seguros, sustentáveis e a custos razoáveis (Portugal Foods, 2012).

Em 2017, de acordo com um inquérito, 1 em 4 pessoas (cerca de 27 %) na população da União Europeia, consumiam fruta pelo menos duas vezes ao dia, 37 % ingeria fruta uma vez ao dia e 36 % consumia fruta menos frequentemente. Dentro dos Estados Membros da UE, o consumo diário de fruta em Portugal, ocorria em 81 % da população, sendo apenas ultrapassado pela Itália, com um consumo diário por 85 % da população (Eurostat, 2019). Assim, encontrando-se como o segundo país mais consumidor de fruta da Europa, é natural que os consumidores procurem novas opções no mercado.

Portugal tem condições climatéricas ideais para a produção de diversos frutos. O sucesso do kiwi e do mirtilo, frutos de introdução recente no mercado português, confirmam este potencial. Além disso, os consumidores são bastante receptivos a frutos vermelhos exóticos, considerados benéficos para o bem-estar. Um destes frutos é o tamarilho, que chega a atingir o preço de 10,00 – 15,00 €/kg na Europa. Vários produtores portugueses começaram a produzir tamarilho devido ao elevado valor dos frutos e à possibilidade de chegar aos mercados do Norte da Europa.

É neste contexto que o Laboratório de Biotecnologia do Centro de Ecologia Funcional da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra tem vindo a trabalhar com esta espécie fruteira com grande potencial produtivo, estabelecendo vários genótipos de tamarilho e desenvolvendo técnicas de propagação desse material através de clonagem *in vitro*.

O trabalho desenvolvido e apresentado nesta dissertação enquadra-se assim no âmbito de um projeto mais alargado – *Melhoramento do tamarilho: plantas melhoradas para produtos de qualidade*, em curso nesse laboratório da Universidade de Coimbra, cujo objetivo

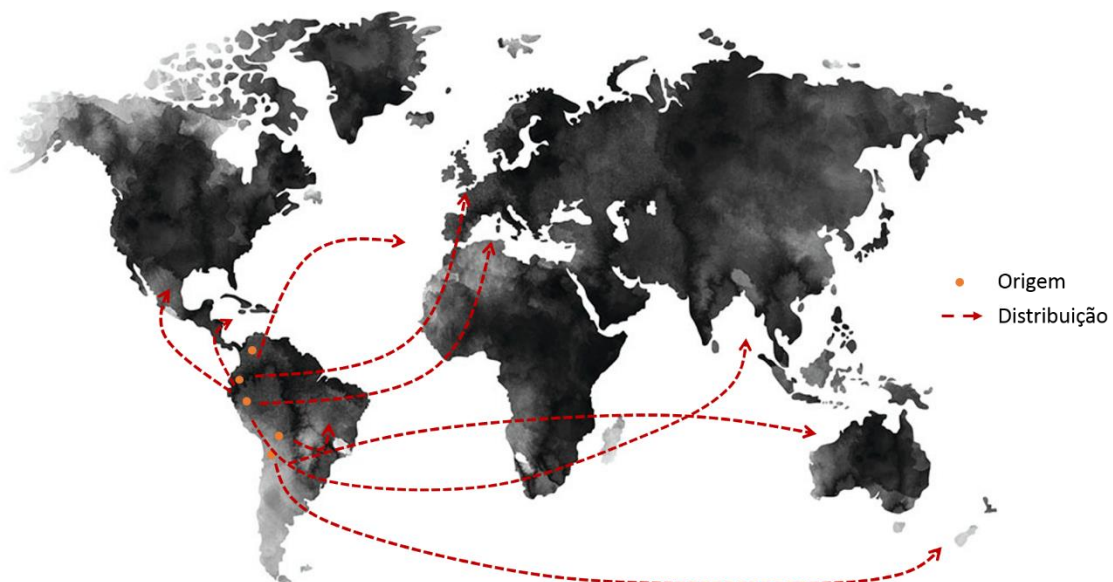
principal é produzir novos genótipos de tamarilho e desenvolver novos produtos derivados deste fruto.

## 1.2. Tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.)

### 1.2.1. Classificação científica e distribuição

O tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.), ou tomate-de-árvore, é uma pequena árvore nativa da região dos Andes, nomeadamente de países como a Bolívia, Chile, Equador, Colômbia e Peru (Hai, 2018).

Na sequência da época dos Descobrimentos, e à semelhança de muitas outras espécies vegetais, a planta foi introduzida em vários países da América Central (México e Índias Ocidentais) e Brasil. Atingiu a Europa no século XIX, através de Portugal (Açores e Madeira). Mais tarde expandiu-se para o Reino Unido e, daí, para várias das então colónias britânicas (Austrália, Índia, Hong Kong, Nova Zelândia e Sri Lanka) (Bohs, 1989, Fig. 1). Hoje em dia, apresenta uma larga distribuição, sendo produzida, maioritariamente por quatro países (Tridge, 2019): Equador (37,04 %), Colômbia (12,96 %), China e Índia (ambas 9,26 %).



**Figura 1** – Origem e distribuição do tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.).

### 1.2.2. Importância económica

O tamarilho é uma baga suculenta, com um sabor ácido característico. Antes da preparação e/ou consumo, o epicarpo e a parte interna do mesocarpo devem ser retirados, uma

vez que possuem um sabor amargo (Prohens e Nuez, 2001). Pode ser consumido de várias formas: quando maduro, pode ser consumido fresco como sobremesa, pulverizado com açúcar (Bakshi *et al.*, 2016), em saladas, como aperitivo ou preparado de várias formas de acordo com o livro de Jan Bilton (1986) Tamarillo Cookbook. É muito valorizado pela indústria alimentar devido ao elevado conteúdo em pectinas, que o tornam especialmente adequado para compotas, geleias e conservas. Possui também propriedades desejáveis para conservas em calda e a produção de polpa, molhos (incluindo *chutney*), comida de bebé e combinados lácteos como iogurtes, batidos e gelados (Prohens e Nuez, 2001). São também usados na produção de licores e poncha (Fig. 2).



**Figura 2** – Exemplos de aplicações do tamarilho. A) Tamarilho em fresco. B) Livro de receitas de tamarilho (Bilton, 2009). C) Doce de tamarilho. D) Chutney de tamarilho (Smith and Caughey's, 2019). E) Licor de tamarilho (Casa de Encosturas, 2017). F) Poncha de tamarilho.

O tamarilho é uma cultura promissora para zonas temperadas. Embora seja considerado uma NUC (Neglected or Underutilized Crop), o cultivo e exportação de tamarilhos tem vindo a aumentar. Este é um fruto que providencia a oportunidade de diversificar a produção fruteira em várias áreas de produção de frutos tropicais, como uma espécie com alto valor monetário. Os preços do tamarilho de qualidade *premium*, nos mercados da América do Norte, Europa e Japão, chegam a atingir valores entre os 12,00 – 15,00 €/kg (Prohens e Nuez, 2001).

### 1.2.3. Descrição botânica e morfológica

O tamarilho cresce como uma árvore pequena ou arbusto, de crescimento muito rápido e com raízes superficiais. A altura varia entre 2 a 4 m, apresentando um tronco vertical que ramifica lateralmente em ramos onde se encontram as flores e os frutos (Schotsmans, 2011). A árvore atinge a maturidade (inicia a produção do fruto) dois anos após a plantação, alcançando o pico de produção no terceiro e quarto anos. Se bem geridas, estas árvores podem viver e produzir por um período de 10 a 12 anos. Apresenta uma elevada capacidade de produção, podendo produzir entre 20 a 30 kg de fruto por ano (Prohens e Nuez, 2001).



**Figura 3** – *Solanum betaceum* Cav. A) Árvore de tamarilho da Mealhada (TVM). B) Flores em diferentes estados de desenvolvimento. C) Frutos. D) Fruto cortado transversalmente onde são visíveis as sementes.

O sistema radicular é superficial e não muito extenso (profundidade até 1 m). As raízes de árvores provenientes de sementeira são profundas e ramificadas, enquanto que as de estacaria são mais superficiais (Núcleo Ambiental SAS, 2015). Apresenta um tronco cilíndrico que se divide em três a partir de 1 a 1,5 m de altura, podendo a planta alcançar, um total de 4 metros (Chacón, 2014) (Fig. 3A). As folhas são perenes, alternadas, ovais e/ou em forma de coração, com ápice agudo e apresentam pubescência em ambas as páginas (Fig. 3A). Exibem nuances de verde desde o claro (amarelado) até ao escuro (arroxeadado). Segundo Sánchez-Vega (1992) a folhagem amarelada está associada à produção de frutos amarelos, enquanto que a arroxeadada se relaciona com frutos vermelho-alaranjado (Chacón, 2014). As flores (Fig. 3B) são hermafroditas, actinomorfas (simetria radial), pentâmeras em forma de estrela e estão dispostas em inflorescências de 10 a 50 flores (Chacón, 2014). Cada inflorescência pode produzir entre 1 a 6 frutos o que significa que há uma elevada percentagem de flores em que o fruto não vinga. A formação dos frutos pode ocorrer sem polinização cruzada, no entanto, as flores são aromáticas e atraem insetos. Esta polinização cruzada parece favorecer a qualidade dos frutos (Hai, 2018).

Os frutos de tamarilho (Fig. 3C) são bagas elíticas ou ovóides, com ápice agudo ou obtuso, e um pedúnculo bem desenvolvido (Núcleo Ambiental SAS, 2015). O epicarpo (casca ou pele) é suave, glabro e geralmente possui riscas longitudinais; as cores deste variam entre o amarelo, laranja, vermelho ou roxo. O endocarpo (polpa; Fig. 3D) possui um sabor doce semi-ácido, é normalmente amarelo, alaranjado ou vermelho arroxeado e possui dois lóculos onde está localizado um grande número de sementes (Chacón, 2014). Estas (Fig. 3D) são achatadas, em forma de rim. No período de formação são brancas e, à medida que alcançam a maturidade, ficam cobertas por uma mucilagem escura, em frutos de casca roxa, e amarela acastanhada em frutos de casca amarela, laranja ou vermelha (Chacón, 2014). Podem encontrar-se entre 200 a 300 sementes por fruto (Núcleo Ambiental SAS, 2015).

#### **1.2.4. Variedades de tamarilho**

Embora o tamarilho apresente uma diversidade considerável de tipos de frutos, apenas alguns foram comercialmente desenvolvidos. Os produtores escolhem plantas saudáveis e com alto rendimento para a colheita das sementes ou recolha de estacas para novas plantações (Prohens e Nuez, 2001). As variedades deste fruto são diferenciadas pela forma, cor e sabor, uma vez que, na sua caracterização morfológica, a planta é muito homogénea. Na região dos Andes, conhecem-se três tipos de frutos, distintos pela cor do epicarpo (no estado maduro): amarelo, vermelho e roxo (Chacón, 2014). Existe ainda uma variedade com casca e polpa laranja, que em termos morfológicos (forma, peso) se assemelha à variedade vermelha (Tabela 1).





As variedades vermelha e roxa são as preferidas dos consumidores para consumo fresco quer na Europa, quer nos Estados Unidos, visto que a cor é mais atrativa, ainda que o sabor seja mais forte e mais ácido que a amarela. O paladar menos ácido torna a variedade amarela mais adequada para conservas (Prohens e Nuez, 2001).

#### **1.2.5. Composição nutricional**

O tamarilho possui propriedades nutricionais interessantes no contexto de uma alimentação saudável, pois os frutos são pobres em calorias e ricos em diversas vitaminas (A, B, C e E) (Prohens e Nuez, 2001). O fruto também é uma fonte importante de  $\beta$ -carotenos (Provitamina A) e ferro. Apresenta elevados conteúdos de potássio, magnésio e fósforo (Núcleo Ambiental SAS, 2015). A tabela 2 indica o conteúdo nutricional de 100 g de fruta comestível de tamarilho (Chacón, 2014; Prohens e Nuez, 2001; Schotsmans 2011).

As características nutricionais das variedades amarela e vermelha estão dentro dos mesmos intervalos, embora se encontrem algumas diferenças significativas, nomeadamente no conteúdo de antocianinas, que é consideravelmente superior na variedade vermelha (Schotsmans, 2011). Os tamarilhos são pobres em gordura, hidratos de carbono e sódio, e ricos em ferro, potássio e vitamina C, mas também em vitaminas A, B6 e E. Possuem uma atividade antioxidante elevada, em comparação com outros frutos, principalmente devido ao elevado conteúdo de vitamina C, mas baixo conteúdo de fenóis solúveis total (Schotsmans, 2011).

**Tabela 1** – Caracterização das diferentes variedades de tamarilho conhecidas (amarelo, vermelho, roxo e laranja).

Variedade		Descrição
	Amarelo	Epicarpo amarelo com riscas longitudinais castanho-esverdeadas pouco perceptíveis (Prohens e Nuez, 2001); mesocarpo amarelo alaranjado; forma oval; peso 50 – 70 g; sabor mais doce que o vermelho e roxo (Chacón, 2014).
	Vermelho	Epicarpo vermelho alaranjado com ténues listras verde-acastanhas (Prohens e Nuez, 2001); mesocarpo alaranjado; forma oval; peso 50 – 80 g; sabor ácido (Chacón, 2014). É a variedade mais conhecida e consumida (Prohens e Nuez, 2001).
	Roxo/Vermelho escuro/Preto	Epicarpo roxo intenso com riscas verdes praticamente imperceptíveis (Prohens e Nuez, 2001); mesocarpo alaranjado; forma redonda e/ou oval; peso 60 – 100 g; sabor mais ácido que o amarelo (Chacón, 2014).
	Laranja	Epicarpo laranja; mesocarpo alaranjado e cremoso; forma oval; peso 50 – 70 g; sabor menos ácido que o vermelho (CRFG, 1996).

### 1.2.6. Propagação e produção do tamarilho

O tamarilho pode ser cultivado utilizando diferentes técnicas, nomeadamente através de processos convencionais, como a sementeira, estacaria ou enxertia ou através de processos biotecnológicos como a micropropagação.

**Tabela 2** – Composição nutricional dos frutos de tamarilho (Chacón, 2014; Prohens e Nuez, 2001; Schotsmans 2011).

Componente	Conteúdo (100 g)	Componente	Conteúdo (100 g)
Calorias	30 kJ	Fósforo	22 mg
Água	85,84 g	Magnésio	19,7 mg
Acidez total	1,0 – 2,4	Manganésio	0,10 mg
Conteúdo de sólidos solúveis (% Brix)	10,0 – 13,5	Potássio	347 mg
pH	3,2 – 3,8	Sódio	8,9 mg
Gordura	0,1 g	Zinco	0,20 mg
Hidratos de Carbono	10,3 g	Niacina (Vit. B3)	1,1 mg
Fibra	1,1 g	Tiamina (Vit. B1)	0,05 mg
Proteína	1,7 g	Riboflavina (Vit. B2)	0,03 mg
Ácido ascórbico	25 mg	Vitamina A	100 mg
Ácido cítrico	1,80 g	Antocianinas	163 mg
Ácido hidroxicinâmico	75 mg DM*	Atividade antioxidante FRAP	1,31 mmol FW*
Ácido málico	0,015 g	Atividade antioxidante	4,2 µmol TROLOX* FW
Ácido quínico	0,80 g	β-carotenos	5,1 mg DM
Cálcio	6 mg	Conteúdo fenólico	81 mg GAE*
Cobre	0,20 mg	Cinza	0,8 g
Ferro	0,4 mg		

\* FW – Fresh Weight; DM – Dry Matter; FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power; GAE – Gallic Acid Equivalents; TROLOX - 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

A sementeira é um processo fácil de realizar, embora as plântulas sejam muito delicadas nas semanas que se seguem à germinação. Estas plantas podem crescer 1,5 a 1,8 m antes de ramificarem, e são ideais para cultivar em ambientes controlados. Tendem a crescer de forma uniforme, todavia, caso venham de plantações com grande variedade de cultivares, ocorrerá polinização cruzada e as plântulas originadas poderão segregar uma série de características (Prohens e Nuez, 2001). As plântulas devem ser plantadas em Outubro e mantidas com boa humidade para que seja obtido um crescimento rápido (Bakshi *et al.*, 2016), e idealmente devem ser mantidas no viveiro até atingirem 1,5 m (Prohens e Nuez, 2001).

Num cultivo através de estacaria, as estacas de tamarilho enraízam facilmente em turfa ou vermiculite, embora possam ser utilizadas auxinas para melhorar o enraizamento. As plantas cultivadas desta forma iniciam a ramificação mais cedo, pelo que as plantas se desenvolvem mais como arbustos, tornando-as mais adaptadas a locais expostos (Prohens e Nuez, 2001). Este processo pode ser realizado no outono ou no verão, iniciando-se com a seleção de estacas de 45 cm de comprimento com 1 ou 2 anos. É necessária a remoção de todas as folhas e um corte reto na base, imediatamente abaixo de um nó (Bakshi *et al.*, 2016). As estacas devem ser obtidas de plantas saudáveis e livres de vírus (Prohens e Nuez, 2001), uma vez que a estacaria é um método que dificilmente garante o crescimento sem infeções virais (Bakshi *et al.*, 2016). As plantas devem ser mantidas no viveiro até atingirem 0,5 a 1 m (Prohens e Nuez, 2001).

A enxertia não é uma técnica tão frequentemente utilizada, no entanto garfos/enxertos de tamarilho têm sido enxertados com sucesso em cavalos/porta-enxertos de *Solanum mauritianum* na Austrália e Nova Zelândia com o objetivo de melhorar a tolerância a solos encharcados através da redução da suscetibilidade do apodrecimento da raiz. Esta técnica é realizada, normalmente, no final do inverno ou início da primavera (Bakshi *et al.*, 2016).

Devido à facilidade na obtenção de plantas de tamarilho provenientes da germinação de sementes, este é um dos métodos mais utilizado na sua produção, mas heterogeneidade genética destas plantas, torna este método inútil quando o objetivo é a propagação de genótipos selecionados. A cultura de tecidos inclui diversos métodos para a propagação de plantas *in vitro* (micropropagação) num meio artificial e em condições assépticas. Para esta técnica podem ser utilizadas diferentes partes da planta como as folhas, nódulos, raízes e meristemas. A necessidade de multiplicar rapidamente cultivares importantes de tamarilho pode ser ultrapassada por esta técnica, que possui grande potencial de facilitar a rápida propagação de materiais elite. O primeiro método de micropropagação a ser desenvolvido para o tamarilho foi a proliferação através de meristemas axilares, seguindo-se a regeneração por organogénese em explantes de folhas e mais tarde a indução de embriogénese somática a partir de explantes com diferentes origens, inclusive de plantas adultas (revisto por Correia e Canhoto, 2012). A regeneração de rebentos também foi observada a partir de hipocótilos, cotilédones, explantes da raiz, discos do limbo e pecíolos (Bakshi *et al.*, 2016).

Independentemente do método de propagação, para um desenvolvimento otimizado das árvores de tamarilho, devem ter-se em atenção diversos parâmetros agroclimatológicos e



agroecológicos, tais como as características do solo, as condições de temperatura e irrigação e o próprio ciclo fenológico da espécie e a sua propensão a pragas e/ou doenças.

O desenvolvimento das plantas de tamarilho é ótimo em solos com textura média de franca a franco-arenosa, permeáveis, profundos, com elevado conteúdo de matéria orgânica e baixo teor de argila ou areia. A planta apresenta boa capacidade de adaptação a solos ligeiramente ácidos ( $5,5 \leq \text{pH} \leq 6,5$ ), mas não tolera solos compactos e sem oxigenação. O solo deve permitir uma boa drenagem, uma vez que excessos de água ou encharcamentos podem provocar a morte da planta em poucos dias (Núcleo Ambiental SAS, 2015).

Quanto às condições de temperatura, o crescimento do tamarilho é mais eficaz em climas temperados, com temperaturas que oscilam entre os 13 e os 20 °C. Temperaturas superiores a 25 °C, ou inferiores a 10 °C, durante o período de floração, levam à queda da flor, afetando o desenvolvimento dos frutos. De forma espontânea, a espécie cresce entre os 1 200 a 3 000 m acima do nível do mar, contudo, a altitude ótima situa-se entre dos 1 800 e os 2 600 m. O tamarilho é uma espécie sensível a radiações solares intensas, pelo que se desenvolve melhor em condições de nebulosidade (frequentes na região dos Andes) (Núcleo Ambiental SAS, 2015).

O tamarilho é uma árvore que necessita de um fornecimento de água relativamente contínuo para ser capaz de alcançar e manter a máxima produção, devido ao sistema radicular superficial (Prohens e Nuez, 2001). Assim, a precipitação média anual deve ser entre 1 500 e 2 000 mm, distribuída uniformemente ao longo do ano, uma vez que a planta não é tolerante ao défice de água, o que pode levar a baixos rendimentos e prejudicar a qualidade do fruto (Núcleo Ambiental SAS, 2015). Durante épocas de seca, a falta de humidade no solo pode influenciar negativamente o crescimento da planta, a produtividade e o tamanho do fruto. Não obstante, um solo encharcado deve ser evitado uma vez que pode levar à morte da planta (Prohens e Nuez, 2001).

Outro aspeto a ter em atenção na produção de tamarilho é o ciclo fenológico da espécie, que é constituído por três fases (Núcleo Ambiental SAS, 2015):

- 1) Vegetativa – Período que ocorre entre o transplante até à floração. Duração: 6 a 8 meses. O crescimento da planta é contínuo, o tronco cresce em altura e as folhas alcançam o seu tamanho máximo.

- 2) **Floração** – Intervalo entre a floração e o início da frutificação. Duração: 7 a 14 meses. Assim que se inicia a floração, as flores mantêm-se de forma permanente.
- 3) **Frutificação** – Fase que se inicia desde a floração e se prolonga até à finalização da produção de frutos. Duração: 17 a 44 meses. A formação do fruto pode demorar entre 21 a 28 semanas.

Relativamente à suscetibilidade a pragas e doenças, o tamarilho é uma espécie para a qual já foram caracterizados os sintomas de diversas pragas e doenças possíveis de afetar a produção (Tabela 3), mas as doenças associadas a infeções por vírus são as identificadas mais frequentemente, nomeadamente em regiões de maior produção, como nos vales de Pichincha no Equador ou na Colômbia (Bakshi *et al.*, 2016). Uma boa manutenção do pomar, a poda e remoção de plantas infetadas, e um bom programa de gestão de pestes pode ajudar na redução de pestes e doenças na cultura

### **1.2.7. Colheita e pós-colheita**

Em climas com poucas variações climáticas durante o ano, o tamarilho floresce e frutifica ao longo do ano, pelo que a colheita pode ocorrer durante todo o ano. Por outro lado, em climas com variações sazonais, climas temperados, a floração e a produção do fruto acontecem na primavera, com o amadurecimento do fruto a decorrer no outono ou inverno. O amadurecimento não é simultâneo, pelo que é necessária a realização de várias colheitas.

A colheita dos frutos de tamarilho realiza-se normalmente quando estes se apresentam totalmente vermelhos (Fig. 4A), amarelos ou roxos, dependendo da variedade. Os frutos podem também ser colhidos quando estão numa fase de maturação, em mudança da cor verde da casca para a cor característica do fruto, e depois tratados com etileno de forma a estimular o amadurecimento. Este é um processo que reduz o insucesso, induz a precocidade e concentra o período de colheita, pois permite que este processo seja antecipado até um mês (Prohens e Nuez, 2001).

Após colheita, os frutos podem ser armazenados durante 12 a 14 semanas a 3,5 a 4,5 °C. Armazenamentos a temperaturas mais elevadas levam a uma multiplicação rápida de doenças pós-colheita, nomeadamente o fungo *Colletotrichum* sp., responsável por grandes perdas. A aplicação de fungicidas providência uma redução de elevada no número de frutos afetados. Outra alternativa para o controlo das doenças, é mergulhar os frutos em água a 50 °C, durante dez minutos. Podem ser utilizadas películas de polietileno para a redução da perda de água e manutenção da qualidade do fruto. O embalamento é normalmente feito em caixas de madeira

ou cartão, com um tabuleiro de tamarilhos (Fig. 4B), ou tabuleiros de plásticos (Prohens e Nuez, 2001).



**Figura 4** – *Solanum betaceum* Cav. A) Tamarilhos maduros na altura da colheita. B) Tamarilhos embalados.

### 1.2.8. Seleção e melhoramento

As variedades de tamarilho, apesar de todos benefícios deste fruto, não têm sido muito exploradas através dos programas de melhoramento. Ainda poucos estudos de melhoramento foram realizados e a maioria das tentativas para introduzir esta espécie em novos ambientes falhou pois dependiam de uma só variedade. Por outro lado, há uma grande preocupação no que respeita a perda da diversidade genética desta cultura e das suas espécies selvagens relacionadas (Prohens e Nuez, 2001).

Apesar de o tamarilho ser fundamentalmente autogâmico, existe algum grau de heterogeneidade dentro das populações, especialmente nas variedades tradicionais. Esta variabilidade aparece quer por mutações espontâneas, quer pela introdução de material genético de outras populações (Bakshi *et al.*, 2016). Existe uma tal diversidade nesta espécie, que em apenas alguns acessos provenientes da sua área de diversificação, a região dos Andes, haveria variabilidade suficiente para iniciar um programa de melhoramento. Esta variabilidade deveria, no entanto, ser melhor explorada através de análises de germoplasma mais detalhadas de forma a identificar os acessos mais interessantes (Bakshi *et al.*, 2016).

Por outro lado, devido à autogamia, em plantações, o tamarilho possui um elevado grau de homozigotia, e como tal, cruzamentos entre indivíduos geneticamente diferentes, originam uma descendência relativamente homogénea. Como cada fruto contém mais de 300 sementes, a produção comercial de tamarilhos híbridos (hibridação intraespecífica) é referida como potencialmente exequível para a criação de novos genótipos de interesse, não havendo,

Tabela 3 – Pragas e doenças da árvore do tamarilho (Chacón, 2014).

<b>Pragas</b> (Chacón, 2014)		
<b>Nome comum</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Caracterização e sintomas</b>
<b>Afídeos</b>	<i>Myzus</i> sp. <i>Aphis</i> sp.	Redução do crescimento vegetativo, deformação e crescimento escasso de rebentos, enrolamento de folhas, presença de negro ou fumagina.
<b>Moscas-da-fruta</b>	<i>Lonchaea</i> <i>Pendula</i> (larva) <i>Anastrepha</i> sp. (mosca)	A larva desta mosca penetra o fruto para se alimentar. A mosca deposita as larvas que se alimentam e provocam apodrecimento secundário (bactérias e fungos).
<b>Percevejo-gaúcho</b>	<i>Leptoglossus zonatus</i>	Endurecimento do fruto devido a uma toxina da sua saliva; é também um vetor da antracnose.
<b>Mosca branca</b>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Alimentam-se da seiva, deixando excrementos (produção de fungos negros que afetam a fotossíntese e qualidade do fruto).
<b>Broca-pequena-do-tomateiro</b>	<i>Neoleucinodes elegantalis</i> (larva borboleta)	Enegrecimento da parte basal da fruta, desenvolvimento prematuro da cor de maturação e mumificação.
<b>Botrytis</b> (Núcleo Ambiental SAS, 2015)	<i>Botrytis cinerea</i>	O micélio é a capa castanho-acinzentada, que se forma à superfície (dispersão pelo vento e manipulação das plantas).
<b>Nemátodos</b>	<i>Meloidogyne</i> sp.	Engrossamento da raiz, impedindo a absorção de nutrientes e água. Provoca o murchar geral, cloroses (amarelecimento das folhas). Se afetar a sementeira ou plantas pequenas a sua morte é rápida.
<b>Doenças</b> (Chacón, 2014)		
<b>Nome comum</b>	<b>Fungo causador</b>	<b>Sintomas</b>
<b>Antracnoses</b>	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	Pequenas manchas oleosas nas folhas e frutos que rapidamente se tornam negras maiores, podendo cobrir totalmente o fruto.
<b>Oídio</b>	<i>Oidium</i> sp.	Afeta o eixo das folhas mais velhas: lesões irregulares brancas, acinzentadas, aspeto empoeirado e manchas necróticas na parte inferior.
<b>Mofa branco</b>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Afeta caule e ramos, provocando lesões cor de café, e na superfície observa-se um crescimento com uma textura semelhante a algodão branco. Deixa o caule oco com manchas negras de tamanho e formas irregulares.
<b>Ferrugem folhear</b>	<i>Alternaria</i> sp.	As lesões em forma de anéis concêntricos acastanhada, maioritariamente na margem de folhas mais velhas.
<b>Murchamento bacteriano</b>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Murchamento progressivo na copa. Afeta o sistema radicular, diminui o suporte e a árvore é facilmente arrancada.
<b>Vírus</b> (Bakshi <i>et al.</i> , 2016)		
<b>Nome comum</b>	<b>Sintomas</b>	
<b>Vírus do mosaico do tamarilho (TaMV)</b>	Manchas com padrão de mosaico irregular, nas folhas e cascas dos frutos. Não há sintomas no interior do fruto e a sua qualidade não é afetada. Após aparecimento de sintomas, o único controlo é remover as árvores severamente afetadas.	
<b>Vírus do mosaico do pepino (CMV) e vírus Y da batata (PVY)</b>	Deformações nas folhas e defeitos na pele do fruto, afetando o seu valor comercial. Os sintomas são mais severos em plantas novas ou não saudáveis, e quando há infeção simultânea de vários vírus na planta.	

todavia, informação acerca do comportamento agronômico dos híbridos F1 (Bakshi *et al.*, 2016). A hibridização interespecífica surge também referida para o tamarilho, tendo sido realizados cruzamentos com sucesso com *Cyphomandra acuminata* e com *Cyphomandra uniloba*, que são espécies morfológicamente muito semelhantes ao tamarilho. Os híbridos obtidos com *C. acuminata* apresentavam baixa fertilidade comparativamente aos obtidos com *C. uniloba* que eram vigorosos e altamente férteis (Bakshi *et al.*, 2016).

Plântulas triploides e tetraploides já foram encontradas, raramente, entre plantações comerciais de tamarilhos diploides, e pensa-se que surgiram da união de gâmetas não reduzidos (Bakshi *et al.*, 2016). A indução de tetraploides de tamarilho através da aplicação de colchicina em sementes germinadas foi também relatada pela primeira vez por Pringle e Murry (1992), mas os poliploides, quer os espontâneos quer os induzidos, apresentam baixa fertilidade (Bakshi *et al.*, 2016). Estudos prévios realizados no LBVUC permitiram obter plantas de tamarilho tetraplóides através da cultura *in vitro* de segmentos nodais na presença de agentes c-mitóticos (Antunes, 2010).

A reduzida taxa de sucesso na hibridização interespecífica ou as reduzidas taxas de fertilidade das plantas obtidas tornam o uso das técnicas tradicionais inadequado para o melhoramento do tamarilho. Métodos biotecnológicos como a clonagem *in vitro* ou a transformação genética surgem como alternativas úteis para ultrapassar essas limitações dos programas de melhoramento, concedendo a oportunidade de obter novos genótipos com características desejadas e propagar os genótipos mais valiosos que possam surgir (Bakshi *et al.*, 2016).

A transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foi já utilizada para a obtenção de plantas de tamarilho resistentes ao TaMV, que foram regeneradas em cultura através da proliferação de meristemas (Atkinson *et al.*, 1994).

As técnicas de micropropagação são assim importantes na obtenção de um grande número de plantas clonais, *i.e.*, geneticamente semelhantes, num curto período de tempo. Pode ser feita *in vitro* através da cultura de meristemas, gomos axilares ou apicais e segmentos nodais, onde há aproveitamento da grande concentração de células meristemáticas com elevada capacidade de divisão (Bhatia, e Sharma, 2015).

### 1.3. Micropropagação

As técnicas de micropropagação surgem como importantes ferramentas em diversos programas de melhoramento, ao permitirem uma produção eficiente e em larga escala de genótipos de interesse (Zimmerman, 1981).

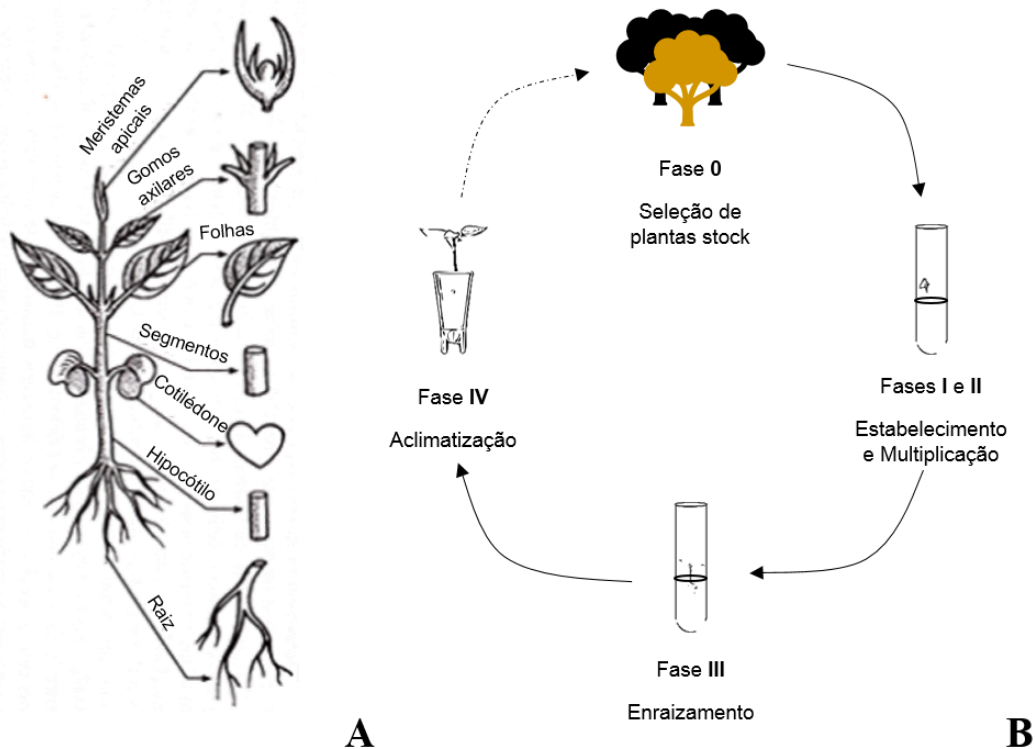
Um ponto-chave nesta técnica é o uso de reguladores de crescimento, particularmente citocininas e auxinas, no meio de cultura. Com o aumento da concentração da citocinina, e por vezes também da concentração da auxina, há o estímulo de gomos axilares ou adventícios. Esta resposta é o que constitui a base da micropropagação. De seguida, a micropropagação deve ser desenvolvida e adaptada a cada espécie, bem como o meio de cultura também pode ter de ser adaptado a uma cultivar (Zimmerman, 1981). PGRs (Plant Growth Regulators) são compostos sintéticos que imitam o comportamento as fito-hormonas que existem naturalmente na planta, muitas vezes possuindo atividade biológica igual ou superior às hormonas endógenas equivalentes (Gaspar *et al.*, 1996).

A micropropagação, que pode ser iniciada através de diferentes explantes, como os meristemas apicais, gomos axilares, folhas, segmentos nodais, cotilédones, hipocótilos e mesmo a raiz, uma vez que todos apresentam potencial para a regeneração de uma planta completa (Fig. 5A) (Raj, 2018). De seguida há um processo de 5 etapas (Fig. 5 B): 1) Fase 0, onde se realiza a seleção de plantas stock/elite, com as características desejadas para a multiplicação em larga escala; Fase 1 (*in vitro*), estabelecem-se as culturas após tratamento com soluções de desinfeção e esterilização; Fase 2 (*in vitro*), multiplicação dos rebentos estabelecidos; Fase 3 (*in vitro* ou *ex vitro*), enraizamento dos rebentos; Fase 4 (*ex vitro*), aclimatização das plântulas provenientes da fase anterior, onde são preparadas para as condições de solo, humidade e temperatura externas (Bhatia e Sharma, 2015).

A micropropagação é possível por três métodos: (i) proliferação de gomos axilares – é estimulado o crescimento destes através de elevadas concentrações de citocinina; (ii) indução de gomos adventícios por organogénese direta ou indireta; (iii) embriogénese somática (Carvalho e Vidal, 2003).

### 1.4. Técnicas de análise na seleção de genótipos de interesse

Num programa de melhoramento é importante o recurso a diversas técnicas que permitem analisar não só a qualidade das plantas, em termos da sua performance, fisiologia ou produtividade, mas também a qualidade dos frutos ou dos produtos deles resultantes.



**Figura 5** – Micropropagação – proliferação por gemas axilares. A) Tipos de explantes (Raj, 2018). B) Etapas da micropropagação.

Essas técnicas podem envolver medição de parâmetros fisiológicos. A água para a rega é um recurso limitado, e a sua gestão eficaz é muito importante, não só na redução de desperdícios no seu uso, como também na redução dos custos de produção e produtividade. Assim, a capacidade de manter processos fisiológicos chave, como a fotossíntese, durante a seca, é indicativo do potencial de manutenção da produtividade em períodos de seca (Silva *et al.*, 2007).

A relação entre a disponibilidade de água e respostas fotossintéticas durante a fase de crescimento pode ser útil na identificação de genótipos tolerantes à seca. Rong-hua *et al.* (2006) demonstrou que métodos indiretos e rápidos para a medição da atividade fotossintética, como a fluorescência da clorofila *a*, particularmente a eficácia fotoquímica máxima do fotossistema II – PSII (determinada através do rácio fluorescência clorofila *a* variável-máximo,  $F_v/F_m$ ) e conteúdo estimado de clorofila (índice SPAD), assim como a medição do potencial hídrico, podem ser eficazes na seleção de genótipos tolerantes *versus* suscetíveis à seca.

### 1.4.1. Espectroscopia ATR-FTIR e de Raman

A monitorização de parâmetros químicos é muito importante, nomeadamente com recurso a técnicas como a espectroscopia Raman ou por infravermelhos (FTIR), uma vez que permite a obtenção de informações qualitativas e quantitativas sobre amostras de alimentos, nomeadamente frutos, relativamente aos componentes principais (água, proteínas, gorduras e hidratos de carbono). Devido às restrições nas normas e legislações aplicadas aos alimentos comercializados e ao aumento na exigência do consumidor, é relevante a identificação e concentração das moléculas presentes numa amostra (da Costa, 2016). A identificação destes compostos permite a seleção dos frutos que apresentam melhor qualidade, permitindo a seleção do genótipo que os produz.

A espectroscopia de ATR-FTIR mede a absorção, pelas moléculas, da luz infravermelha, através da transmitância ou absorvância de uma amostra como uma função da frequência de radiação dentro desta região do espectro. À temperatura ambiente, as moléculas ocupam, maioritariamente, o seu estado fundamental energético, e podem ser excitadas para estados vibracionais superiores absorvendo luz infravermelha a frequências específicas, dependendo dos grupos funcionais, e assim, das ligações químicas envolvidas nos processos de absorção. Cada molécula tem a sua impressão no espectro infravermelho, uma vez que cada ligação absorve na sua frequência específica (Hollas, 2007). As moléculas podem ter uma ou várias ligações e, conseqüentemente, o número de modos vibracionais varia dependendo do número de átomos e dependendo disto podemos ter uma molécula linear ou não linear. Assim uma molécula linear tem  $3N-5$  modos vibracionais e uma molécula não linear apresenta  $3N-6$  modos vibracionais ( $N$  – número de átomos) (Workman, 2001), que podem ser ativados na espectroscopia de Raman ou IR.

Quando a luz interage com matéria, os fótons podem ser absorvidos ou dispersos. No caso da dispersão (dispersão), os fótons, frequentemente, podem continuar com a mesma energia que a luz incidente (dispersão elástica) – efeito Rayleigh. De forma menos comum (apenas um fóton em  $10^6 - 10^7$ ), podem apresentar uma energia diferente (difusão inelástica) – efeito Raman. Assim, a espectroscopia de Raman foca-se na dispersão inelástica da luz. Quando a luz dispersada apresenta uma frequência diferente da incidente, pode ser superior (a excitação ocorre do estado fundamental para um estado vibracional superior) – Raman Stokes, ou inferior (frequência menor do que a incidente) – Raman Anti-Stokes (Demtröder, 2008). Quando há interação fóton-matéria, existe absorção durante um curto intervalo de tempo. Isto leva à mudança do estado molecular do fundamental ( $S_0$ ) para um estado virtual,



no qual se forma um complexo luz-molécula instável, diferente do primeiro estado excitado ( $S_1$ ) (Smith e Dent, 2005). O passo seguinte ocorre quando a molécula volta ao estado fundamental. Durante este processo, uma pequena parte dos fótons troca energia com as moléculas, produzindo as alterações nas suas frequências acima mencionadas (Raman e Krishnan, 1928).

De acordo com Jamieson *et al.* (2018), a técnica de Raman, tem sido aplicada extensivamente para a caracterização de diversos compostos. Neste trabalho foram analisados os ácidos gordos e foram encontrados diferentes picos em regiões associados à presença de diferentes ligações:  $1262\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta(=C-H)$ ),  $1438\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta(CH_2)$ ),  $1655\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(C=C)$ ),  $2850\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(C-H)$  em grupos  $CH_2$ ),  $2933\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(C-H)$  em grupos  $CH_3$ ) e  $3005\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(=C-H)$ ), ou deslocamentos próximos, uma vez que variam com as espécies em estudo. Foi também possível estabelecer relações entre os diferentes picos obtidos com o comprimento de onda de  $532\text{ nm}$ , permitindo obter diferentes informações (Tabela 6).

**Tabela 4** – Parâmetros das retas de calibração de regressão linear com os valores de  $r^2$ , a  $532\text{ nm}$  (Jamison *et al.*, 2018).

Rácio	Declive	Ordenada na origem	$R^2$	Informação
$1262\text{ cm}^{-1} / 1438\text{ cm}^{-1}$	$0,613 \pm 0,02426$	$-0,134 \pm 0,06354$	0,9922	Número de ligações C=C – grau de insaturação
$1655\text{ cm}^{-1} / 1438\text{ cm}^{-1}$	$28,15 \pm 2,244$	$-0,4347 \pm 0,6263$	0,9692	Número de ligações C=C / número de grupos $CH_2$
$3005\text{ cm}^{-1} / 2850\text{ cm}^{-1}$	$1,249 \pm 0,0959$	$0,03831 \pm 0,05348$	0,9714	Número de H-C= / número de grupos $CH_2$
$2850\text{ cm}^{-1} / 2933\text{ cm}^{-1}$	$0,1738 \pm 0,01968$	$-1 \pm 0,2285$	0,9397	Número de grupos $CH_2$ / número de grupos $CH_3$ – comprimento da cadeia

#### 1.4. Objetivos

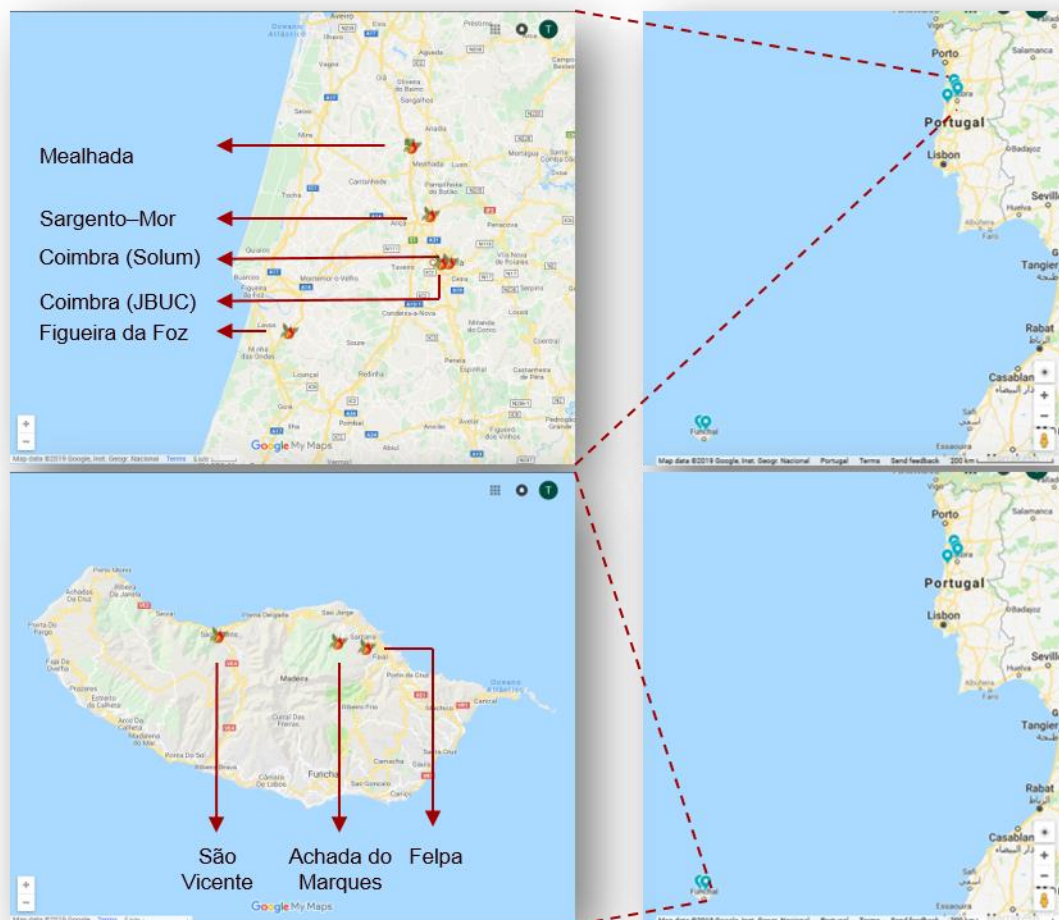
Em qualquer espécie fruteira uma gestão eficaz das plantações, a utilização de genótipos de qualidade e a manutenção pós-colheita são aspectos essenciais para rentabilizar a produção. Um melhor conhecimento da fisiologia das plantas e suas necessidades nutricionais, e dos mecanismos de formação do fruto permitirão melhorar os sistemas de cultivo.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar, micropropagar e selecionar plantas de tamarilho com potencial para serem utilizadas na produção agro-alimentar. Para atingir este objectivo foram avaliadas, para linhas estabelecidas em anos diferentes – em 2014 de material adulto e mantido em subculturas desde então e estabelecidas em 2018 através da germinação de sementes *in vitro* – as taxas de multiplicação, enraizamento e aclimatização, com posterior comparação de performances de plantas obtidas de enraizamento *in vitro* e *ex vitro* com e sem IBA. Nas plantas sobreviventes 60 dias após transferência para a estufa exterior, foram avaliados parâmetros fotossintéticos (fluorescência da clorofila *a*), potencial hídrico e biomassas (parte aérea e raízes). Foram também realizadas avaliações dos frutos, quer ao longo do amadurecimento, quer no estado maduro, pronto a consumir, de frutos laranjas, vermelhos e amarelos de diferentes localidades. Para esta avaliação foram realizados estudos biométricos, sensoriais e físico-químicos.

## 2. Materiais e Métodos

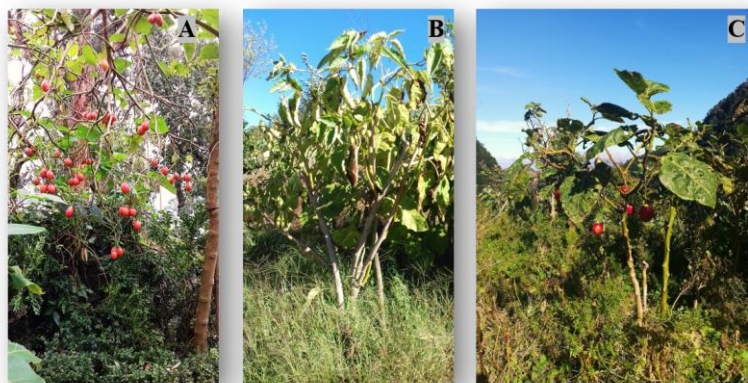
### 2.1. Material Vegetal

De acordo com os objetivos propostos neste trabalho foram avaliados dois tipos de material vegetal: frutos colhidos em árvores provenientes de diversos locais na região de Coimbra e na ilha da Madeira (Fig. 6 e 7; Tabela 4) e plantas de tamarilho estabelecidas e propagadas *in vitro* a partir de explantes com diferentes origens (Tabela 5).



**Figura 6** – Locais de recolha dos frutos de tamarilho em Portugal continental e na ilha da Madeira para análise e caracterização. Indicação dos 5 locais de recolha na região de Coimbra e 3 locais de recolha na vertente norte da ilha da Madeira.

O material vegetal utilizado para a avaliação do potencial de micropropagação provinha de duas origens (Tabela 5): 1) material clonal selecionado e previamente estabelecido de material adulto, em subcultura desde 2014, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UC e 2) material proveniente da germinação de



**Figura 7** – Árvores de tamarilho. A) Exemplar do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. B) Exemplar da Mealhada. C) Exemplar da Madeira.

sementes *in vitro*, no mês de Abril de 2018, e posteriormente micropropagado a partir dos meses de Maio e Junho do mesmo ano.

**Tabela 5** – Identificação das árvores utilizadas para recolhas dos frutos analisados, com indicação da sua localização e do estado de amadurecimento com que os frutos foram colhidos (durante o amadurecimento, entre Outubro e Dezembro de 2018, em transição de coloração verde para vermelho ou laranja, ou já maduros, em Dezembro de 2018, com coloração totalmente vermelha ou laranja).

Localização das árvores	ID	Variedade	Recolha dos frutos	
			Amadurecimento (Out-Dez 2018)	Maduros (Dez 2018)
Figueira da Foz	TFF	Vermelho	Sim	Sim
Coimbra (Jardim Botânico da Universidade de Coimbra) (Fig. 7 A)	TJB 0	Vermelho	Sim	Sim
	TJB 1	Vermelho	Sim	Sim
	TJB 2	Vermelho	Não	Sim
	TJB 3	Vermelho	Sim	Sim
	TJB 5	Laranja	Sim	Sim
	TJB 6	Laranja	Não	Sim
	TJB 7	Laranja	Não	Sim
	TJB 12	Vermelho	Não	Sim
Mealhada (Fig. 7 B)	TLM 7	Laranja	Não	Sim
	TVM 15	Vermelho	Não	Sim
	TVM 28	Vermelho	Não	Sim
	TVM 38	Vermelho	Não	Sim
Sargento-Mor	TMC	Vermelho	Não	Sim
Coimbra (Solum)	TCS	Vermelho	Não	Sim
Madeira (Achada do Marques)	TMI	Vermelho redondo*	Não	Sim
Madeira (Felpa) (Fig. 7 C)	TMR	Vermelho regional**	Não	Sim
Madeira (São Vicente)	TMA	Amarelo	Não	Sim

\*Tamarilho da Madeira Importado – os produtores guardam sementes de tamarilhos importados da Colômbia (fruto de formato arredondado) e obtêm novas árvores a partir da germinação dessas sementes;

\*\*Tamarilho da Madeira Regional – frutos de formato alongado que os produtores obtêm de material vegetal original da ilha da Madeira.

**Tabela 6** – Identificação das linhas de plantas micropropagadas.

Linhas previamente estabelecidas de material adulto (em 2014)		Linhas estabelecidas da germinação de sementes (em 2018)	
Origem e caracterização	ID	Origem e caracterização	ID
Germinação de semente e multiplicação clonal de <b>tamarilho vermelho redondo</b> (importado da Colômbia)	TSM	Germinação de sementes e multiplicação policlonal de <b>tamarilho vermelho alongado</b> (árvores do JBUC)	TJB 0 TJB 1 TJB 6 TJB 8 TJB 11 TJB 12
Germinação de semente e multiplicação clonal de <b>tamarilho vermelho alongado</b> (árvores do JBUC)	TAM 1 TAM 2 TAM 3 TAM 4 TAM 5 TAM 6 TAM 7 TAM 8	Germinação de sementes e multiplicação policlonal de <b>tamarilho laranja</b> (árvores do JBUC)	TJB 5 TJB 7 TJB 9
Multiplicação clonal de <b>tamarilho tetraploide</b> (induzido a partir de TAM 7)	TT		
Multiplicação clonal de <b>tamarilho vermelho redondo</b> (árvore adulta localizada em Leiria)	TR		

## 2.2. Avaliação do potencial de micropropagação das linhas de tamarilho

### 2.2.1. Germinação de sementes e estabelecimento *in vitro* de plantas de tamarilho

Previamente à germinação, as sementes de nove árvores do JBUC (TJB 0, TJB 1, TJB 5, TJB 6, TJB 7, TJB 8, TJB 9, TJB 11, TJB 12; ver Tabela 4) foram reidratadas durante 24 horas e sujeitas a desinfecção com solução de hipoclorito de cálcio 5 % (p/v), durante 5 minutos. Após três lavagens com água destilada esterilizada, as sementes foram colocadas a germinar. A germinação foi realizada de duas formas distintas:

- Em caixas de Petri com algodão e papel de filtro esterilizados e humedecidos com água destilada estéril. Doze sementes reidratadas e desinfetadas foram uniformemente distribuídas em cada placa de Petri, num total de 9 placas.
- Em tubos de ensaio (15 x 2,2 cm) com 12 mL/tubo de meio MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado com 1 % (p/v) sacarose. Antes da adição de 7 g/L de agar, o pH foi ajustado a 5,7, usando KOH ou HCl e, de seguida, os meios foram autoclavados a 121 °C durante 20 minutos. Nove sementes de cada árvore foram inoculadas, uma por cada tubo.

Em ambos os casos, as sementes foram colocadas a germinar no escuro, a 25 °C (Fig. 8) até ao início da germinação, *i. e.*, aquando da emergência da radícula (aproximadamente quatro semanas), e as taxas de germinação foram registadas. Após esta etapa, todas as sementes que germinaram em placas foram transferidas individualmente para tubos de ensaio com 12 mL/tubo de meio MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado com 3 % (p/v) sacarose e 0,2 mg/L BAP (benzilaminopurina) e o pH ajustado a 5,7. Nesta fase todas as sementes terminaram a germinação em câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade de irradiação de 15 – 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**Figura 8** – Germinação de sementes em tubos de ensaio e placas de Petri no escuro.

### **2.2.2. Avaliação das taxas de multiplicação, enraizamento e sobrevivência de plantas com diferentes origens**

As taxas de multiplicação, enraizamento e sobrevivência após aclimatização foram comparadas entre plântulas germinadas de sementes e micropropagadas em 2018 e plântulas obtidas da multiplicação de rebentos previamente estabelecidos a partir de linhas clonais desde 2014 (Tabela 5; Fig. 11 – esquema ilustrativo). O primeiro parâmetro avaliado foi a taxa de multiplicação das diferentes linhas. Os segmentos nodais e ápices (comprimento

mínimo de 1 cm), provenientes de rebentos das 9 linhas estabelecidas em 2018 (Fig. 9A) e das 11 linhas estabelecidas em 2014, foram subcultivados a cada cinco semanas durante 10 semanas ( $t_0$  início da cultura,  $t_1$  primeira subcultura à 5ª semana,  $t_2$  – segunda subcultura à 10ª semana) em meio MS com 3 % (p/v) de sacarose, 0,2 mg/L BAP e 7 g/L de agar (pH 5,7), em caixas Combiness Microbox de 11 x 8 cm, 565 mL de capacidade, e com filtros XXL. As culturas foram mantidas na câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade de 15 – 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Ao fim de cinco ( $t_1$ ) e dez ( $t_2$ ) semanas os rebentos obtidos para cada linha foram avaliados através da medição dos seguintes parâmetros: diâmetro do calo formado na base do rebento, altura do rebento, número de nós e número de fitómeros possíveis de obter a partir de cada rebento (Fig. 9B). As taxas de multiplicação no final da segunda subcultura foram determinadas, através da seguinte equação:

$$\text{Taxa de multiplicação (\%)} = \frac{\# \text{ fitómeros } (t_2) - \# \text{ fitómeros } (t_0)}{\# \text{ fitómeros } (t_2)} \times 100$$

O próximo passo foi a indução de enraizamento dos rebentos provenientes do processo de multiplicação. Foram comparados três processos de enraizamento:

- *In vitro* (Fig. 9C): os segmentos (comprimento mínimo de 2 cm) foram subcultivados para meio MS com 3 % (p/v) de sacarose e 7 g/L de agar (pH 5,7) em caixas Combiness Microboxx 11 x 12 cm, com 565 mL de capacidade e filtros XXL e mantidos na câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz com 15 – 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O número de rebentos utilizados neste ensaio foi de  $9 \leq n \leq 30$  para as linhas estabelecidas em 2018 e de  $1 \leq n \leq 17$  para as linhas clonais estabelecidas em 2014.
- *Ex vitro* (Fig. 9D): os segmentos (comprimento mínimo de 2 cm) foram cortados e colocados diretamente em substrato sem qualquer tratamento adicional. O substrato utilizado foi uma mistura turfa:perlite (2:1) humedecida. Neste ensaio foram apenas utilizados rebentos provenientes das linhas estabelecidas em 2018 ( $3 \leq n \leq 12$ ).
- *Ex vitro* com IBA (Fig. 9D): os segmentos (comprimento mínimo de 2 cm) foram cortados e a parte basal do segmento mergulhada rapidamente ( $\leq 1$  segundo) numa solução de IBA 0,5 mg/L. Este ensaio, com a finalidade de avaliar a necessidade de

choque auxínico na promoção do enraizamento *ex vitro* foi realizado com  $3 \leq n \leq 11$  rebentos provenientes das linhas estabelecidas em 2018.

Ambos os ensaios de enraizamento *ex vitro* foram realizados em estufins, que consistem em tabuleiros de 35 cm x 22 cm, com 77 poços, e cobertos com uma tampa com grelhas que permitem manter os valores de humidade acima de 90 %, nos primeiros dois a três dias. As grelhas e a tampa foram abertas, e a tampa removida, de forma gradual, o que permitiu a aclimatização em simultâneo das plantas. Os estufins estavam colocados numa câmara climática (*FitoClima 10000 HP*, Aralab, Portugal) a 25 °C, 70 % humidade relativa, com fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade de  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Ao fim de cinco semanas ( $t_1$ ), o enraizamento foi avaliado através da realização de estudos de rizometria e medição de taxas de enraizamento. Para a rizometria em  $1 \leq n \leq 3$  plantas, foram medidos o comprimento da raiz maior e o número de raízes secundárias. Para essas mesmas plantas foi também medido o comprimento da parte aérea e a biomassa (das raízes e da parte aérea). A medição da biomassa foi feita pela pesagem do peso seco após secagem do material em estufa a 40 °C durante 7 dias. As taxas de enraizamento foram calculadas com a aplicação da seguinte equação:

$$\text{Taxa de enraizamento (\%)} = \frac{\# \text{ plântulas enraizadas } (t_1)}{\# \text{ rebentos colocados a enraizar } (t_0)} \times 100$$

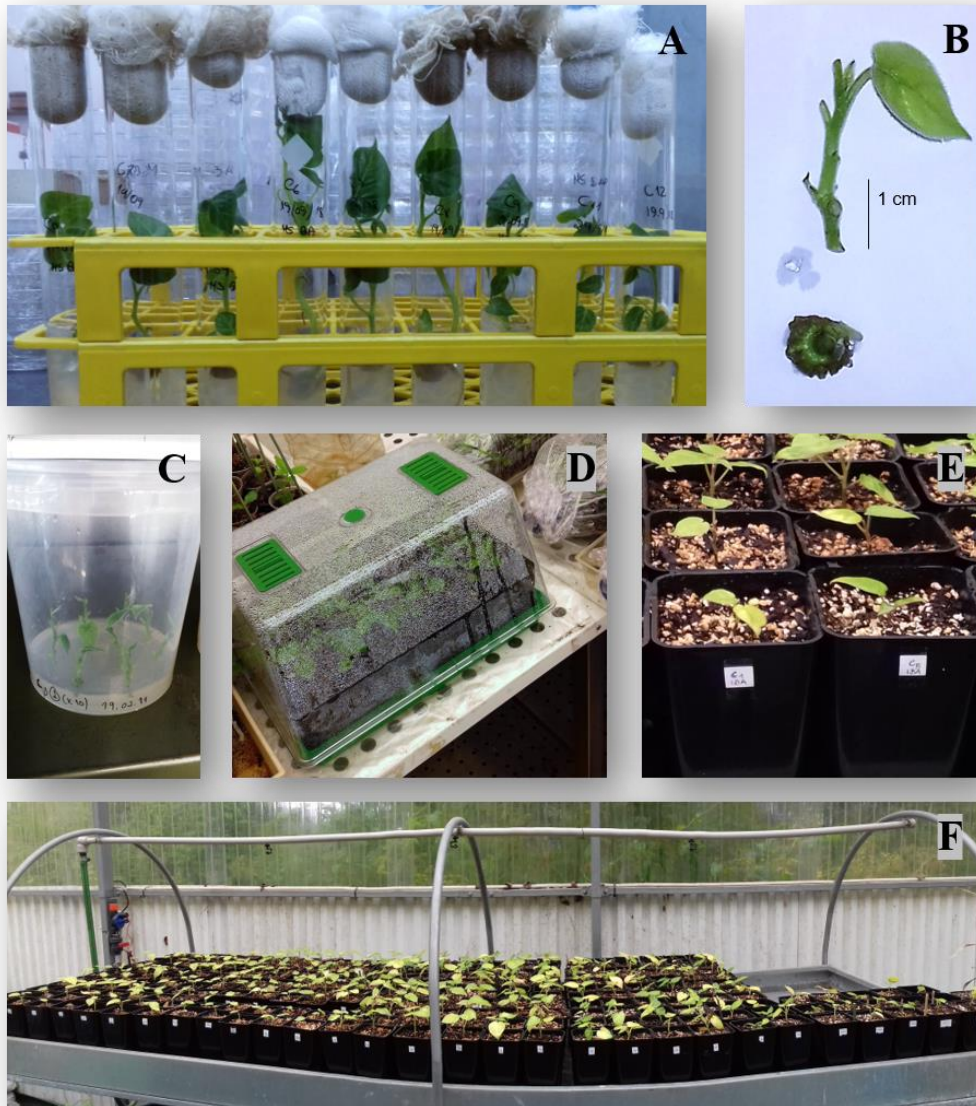
As plantas cujo enraizamento foi realizado *in vitro*, e com uma altura mínima de 2 cm, foram aclimatizadas através do processo da transferência das plantas para estufins semelhantes aos descritos anteriormente (Fig. 9 D), com humidade  $\geq 90$  %, nos primeiros dois a três dias. O substrato era composto pela mistura turfa:perlite (2:1) humedecida. O número de plantas passadas para aclimatização foi de  $9 \leq n \leq 28$  para as linhas estabelecidas em 2018 e de  $1 \leq n \leq 13$  para as linhas clonais estabelecidas em 2014.

As taxas de sobrevivência após aclimatização, para todas as plantas provenientes dos 3 ensaios de enraizamento e aclimatização, foram calculadas através da equação:

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = \frac{\# \text{ plantas sobreviventes } (t_1)}{\# \text{ plântulas colocadas a aclimatizar } (t_0)} \times 100$$



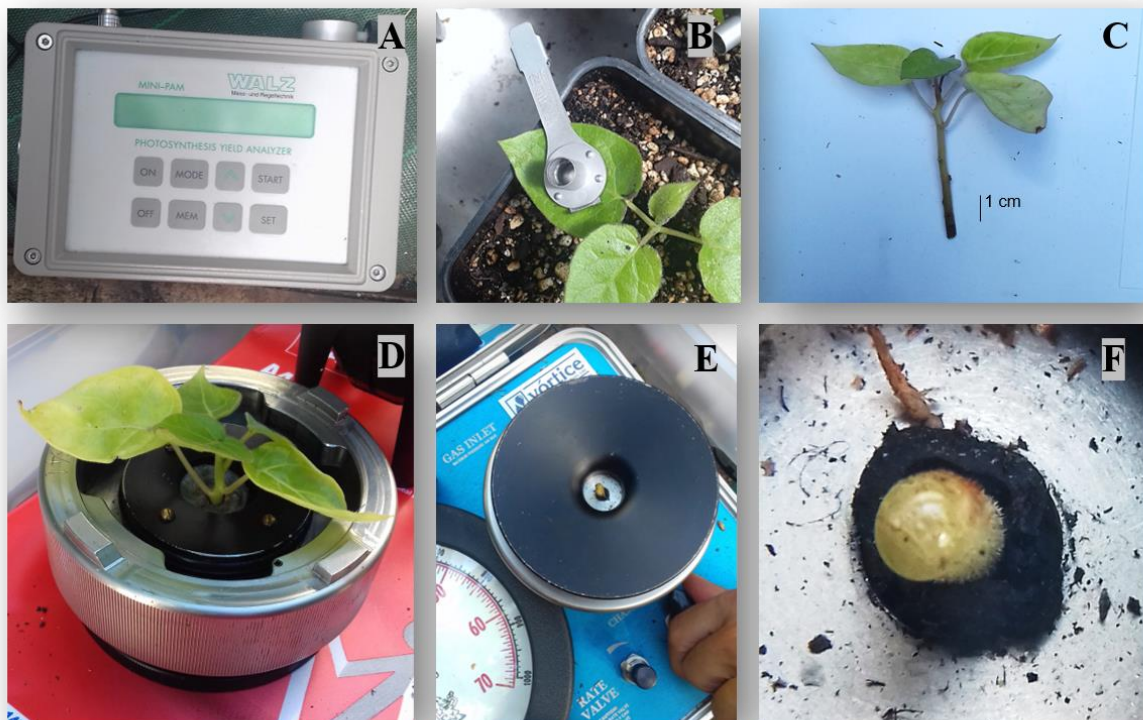
O passo seguinte consistiu na transferência das plantas sobreviventes dos estufins para tubetes (com 1 L de capacidade) (Fig. 9E), com o mesmo substrato (turfa:perlite, 2:1). Estes vasos permaneceram uma semana na mesma câmara climática e foram depois transferidos para a estufa exterior (Fig. 9F), onde tiveram regas regulares, de dois em dois dias, durante 11 e 8 semanas (*ex vitro* e *in vitro*, respetivamente), até à medição dos parâmetros fisiológicos e morfológicos registados para as plantas aclimatizadas.



**Figura 9** – Avaliação das taxas de multiplicação, enraizamento e sobrevivência de plantas com diferentes origens. A) Linhas clonais estabelecidas a partir de germinantes (2018). B) Avaliação da propagação. C) Enraizamento *in vitro*. D) Enraizamento *ex vitro* e aclimatização. E) Transferência das plantas para tubetes (capacidade de 1L). F) Plantas na estufa exterior.

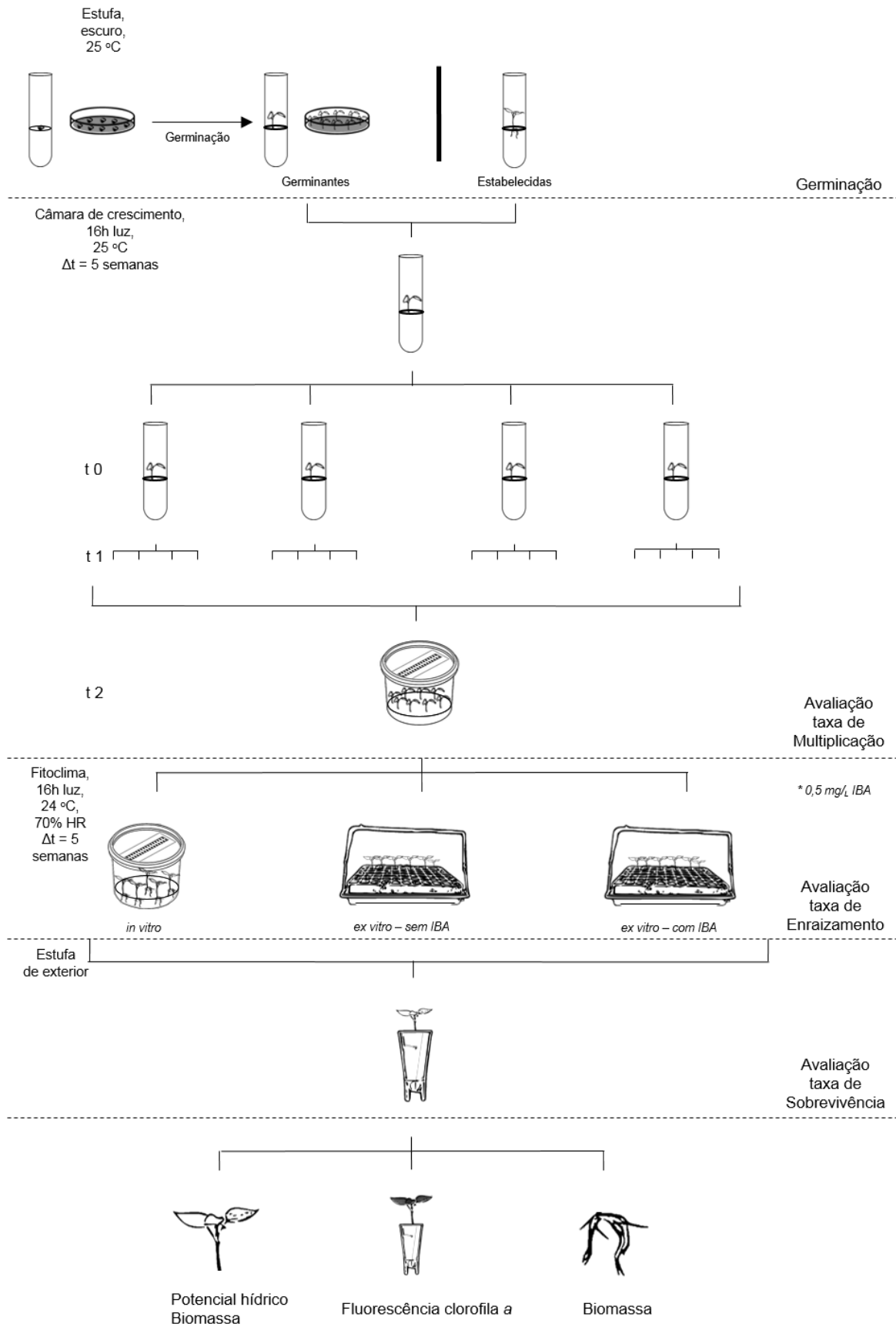
### 2.2.3. Avaliação de parâmetros fisiológicos e morfológicos

A fluorescência da clorofila *a* foi determinada *in situ*, com um fluorómetro portátil Mini-PAM (Walz, Effeltrich, Germany) (Fig. 10A), como descrito por Chávez-Arias *et al.* (2019) (Fig. 10B). Os valores dos rendimentos máximo ( $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$ ) e efetivo ( $\Phi_{PSII} = (F'_m - F'_0) / F'_m$ ) do fotossistema II, foram determinados conforme descrito neste artigo. O princípio da fluorescência da clorofila passa pelo facto de a incidência de luz, numa folha, poder ser utilizada na fotossíntese, ser dissipada ou, neste caso, ser reemitida como luz – fluorescência da clorofila. No caso da fluorescência máxima ou rendimento máximo, uma pinça é aplicada para que parte da folha fique no escuro antes de ser aplicada uma luz forte. Desta forma, há garantia de que todos os centros de reação estejam abertos. Assim que a luz entre em contacto com a folha, o fotossistema II absorve a luz, os eletrões são aceites e transportados na cadeia de eletrões; isto vai “fechar” o centro de reação, que vai manter-se fechado até que o primeiro eletrão passe para outro carregador de eletrões (Maxwell e Johnson, 2000). Já na medição do rendimento efetivo, a folha é deixada a adaptar-se à luz. Como já tem centros de reação fechados, o valor será menor.



**Figura 10** – Avaliação de parâmetros fisiológicos e morfológicos. A) Fluorómetro portátil Mini-PAM (Waltz Effeltrich Germany). B) Medição do rendimento máximo da fluorescência máxima do fotossistema II. C) Avaliação do crescimento. D), E) e F) Medição do potencial hídrico ( $\psi_w$ ).

O potencial hídrico ( $\psi_w$ ) foi medido numa bomba de Scholander (PMS Instrument Co., Albany, OR, USA); a planta foi cortada na base do caule, com uma lâmina de bisturi afiada, e colocada na câmara (Figs. 10D e 10E). A câmara foi selada, e foi aplicado azoto, gradualmente, de forma a aumentar a pressão, até ao ponto em que uma gota de água foi forçada a sair (observável com lupa com 15 x de aumento) (Fig. 10F) (Chávez-Arias *et al.*, 2019). Das plantas cortadas, e respetivas raízes, foi medida a biomassa (Fig. 10C) (estufa, 40 °C, 15 dias) (Fig. 11 – esquema ilustrativo).



**Figura 11** – Esquema ilustrativo da avaliação das taxas de propagação, enraizamento e sobrevivência e de parâmetros fisiológicos e morfológicos de plantas com diferentes origens.

### 2.3. Avaliação da qualidade dos frutos

Os frutos avaliados foram obtidos de várias localizações da região de Coimbra e da ilha da Madeira (ver secção 2.1).

Foram realizados dois tipos de recolha com a finalidade de diferentes análises:

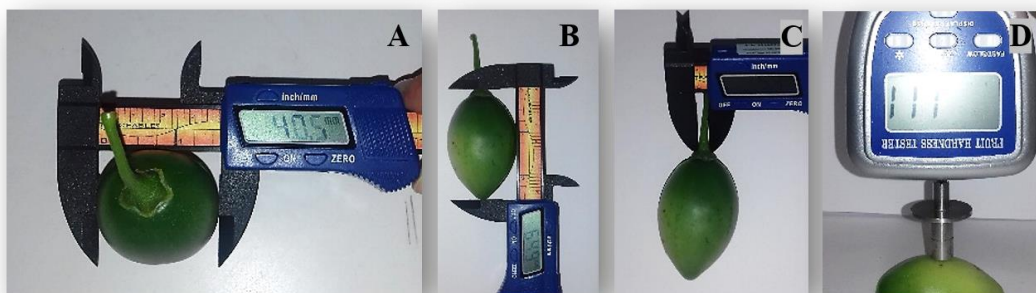
- Acompanhamento do amadurecimento, ao longo de cinco recolhas, com intervalos de cerca de três semanas, durante três meses (Outubro a Dezembro), para avaliar as alterações físicas (diâmetro e comprimento, peso e firmeza) e químicas (conteúdo de sólidos solúveis e acidez) que ocorrem durante o processo de amadurecimento.
- Recolha dos frutos no estado maduro, i. e. o estado no qual os frutos já adquiriram tonalidade vermelha ou laranja e podem ser consumidos ou comercializados.

As amostras ( $5 \leq n \leq 7$ ), eram constituídas por frutos representantes, visualmente (cor e firmeza), do estado de maturação da totalidade dos frutos nas árvores em que foram recolhidos. As análises foram efetuadas no próprio dia, ou no dia seguinte à recolha, de forma a que o estado de maturação não fosse afetado por fatores externos como o tempo desde a colheita ou a temperatura ambiente.

#### 2.3.1. Parâmetros biométricos e análise sensorial

Todos os parâmetros biométricos (diâmetro, comprimento e peso – fruto e pedúnculo) foram medidos com uma craveira e uma balança, e a análise sensorial foi realizada (métodos não destrutivos).

O diâmetro do fruto foi medido na zona mais larga do fruto (Fig. 12A) e o do pedúnculo na sua base (Fig. 12C). O comprimento do fruto foi medido da base do fruto até à base do pedúnculo (Fig. 12B). A firmeza foi determinada usando o valor obtido no medidor de firmeza digital (Precision Hardness Sclerometer, Fr – 5120), aplicando-se uma força vertical



**Figura 12** – Avaliação da qualidade dos frutos – Parâmetros biométricos e análise sensorial. A) Diâmetro do fruto. B) Comprimento do fruto. C) Diâmetro do pedúnculo. D) Firmeza do fruto.

até surgir uma marca da sonda na superfície do fruto (Fig. 12D), dividindo-se pela área da sonda.

### 2.3.2. Parâmetros físico-químicos

No que diz respeito à análise físico-química foi necessário o processamento do fruto: após a remoção dos pedúnculos, para a análise do conteúdo dos sólidos solúveis (CSS), o fruto foi cortado em metades e 1 mL foi colocado diretamente no refratômetro (Kern® optics, Digital Refractometer, ORD 85BM); para a determinação da acidez, ambas as metades dos frutos foram colocadas num recipiente e processadas com uma varinha mágica até à obtenção de uma pasta densa. Esta pasta foi sujeita a centrifugação (12 minutos, 5 000 rpm, 23 ° C). No final deste passo, foi obtida uma solução trifásica (sementes e casca; polpa; sumo). Finalmente, para a medição da acidez, foi necessária uma diluição de 1:50 do sumo, e, aproximadamente, 0,60 mL da solução diluída, foram colocados no medidor de acidez.



**Figura 13** – Avaliação da qualidade dos frutos – Parâmetros físico-químicos. A) Medição do conteúdo de sólidos solúveis. B) Fruto processado (pré-centrifugação). C) Solução trifásica (pós-centrifugação). D) Medição da acidez.

### 2.3.4. Análise química (ATR-FTIR e Raman)

A amostra foi composta por  $n = 1$  fruto, de quatro grupos diferentes: TJB 1 (tamarilho vermelho do JBUC), TJB 5 (tamarilho laranja do JBUC), TMI (tamarilho redondo da Madeira) e TVM (tamarilho vermelho alongado de Sargento-mor). Os frutos foram divididos em quatro zonas: epicarpo externo e interno, mesocarpo (polpa) e semente de cada um dos frutos. As quatro zonas dos frutos provenientes das quatro origens diferentes foram analisadas por espectroscopia de infravermelhos (ATR-FTIR) e Raman.

Ao longo deste trabalho foi utilizado o modo ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infra Red), onde uma onda evanescente é gerada ao longo da superfície da amostra. Graças a este fenómeno, as amostras podem ser estudadas em estado sólido e

líquido, sem alterar significativamente as suas estrutura e propriedades. Assim, as principais vantagens desta técnica passam pela recuperação da amostra intacta após a análise, pequena quantidade de amostra necessária (suficiente para cobrir o vidro) e pouco ou nulo pré-tratamento da amostra necessário. Os espectros ATR-FTIR foram obtidos como descrito por Martín *et al.* (2019), à exceção do fator corretivo que não foi aplicado. Foi usado um espectrómetro Bruker Optics Vertez 70 FTIR. Cada espectro é a soma de 128 scans, com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ . Ulteriormente, os espectros foram normalizados de acordo com a banda de intensidade atribuída à água ( $3271,88\text{ cm}^{-1}$  (sementes, epicarpo interno);  $3272,23\text{ cm}^{-1}$  (mesocarpo);  $3550,26\text{ cm}^{-1}$  (epicarpo externo) – em todos os casos, o máximo pertencente ao respetivo sinal.

Os espectros de Raman foram obtidos à temperatura ambiente, num sistema de microscopia confocal Raman WITec alfa300 R, acoplado a um Ultra-High-Throughput-Spectrometer UHTS 300 VISNIR (comprimento focal: 300 mm; 600 linhas/mm blazed for 500 nm grating), no intervalo  $3750 - 500\text{ cm}^{-1}$ . O sistema de deteção foi uma câmara CCD com Peltier termoelectricamente arrefecida a uma temperatura  $\leq -55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , chip com  $1650 \times 200$  pixels, iluminado com revestimento NIT/VIS AR, com resolução  $< 0,8\text{ cm}^{-1}/\text{pixel}$ . A potência de saída e comprimento de onda do laser foram 55 mW e 532 nm, respetivamente. Foi usada uma objetiva Zeiss “Epiplan” 100 x (NA 0,80; WD 1,3 mm). Foram realizadas 5 aquisições de 10 segundos cada uma. Todos os espectros apresentados neste trabalho foram corrigidos relativamente a uma baseline e normalizados pelo sinal mais intenso de cada espectro.

#### **2.4. Análise estatística**

Todos os dados foram registados, e os gráficos foram obtidos do software Grahpad Prism 6 e foram aplicados testes ANOVA de uma e duas vias, à exceção dos dados da análise química dos frutos, que foram tratados no software OriginPro. 9.1.





### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Germinação de sementes e estabelecimento *in vitro* de plantas de tamarilho

A germinação de diferentes sementes das árvores do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra forneceu os resultados apresentados na tabela 7. Cada Plântula obtida por germinação foi colocada em tubos de ensaio, isoladamente. Ulteriormente, foram micropropagadas em meio de multiplicação, e transferidas para meio e/ou substrato de enraizamento, colocadas a aclimatizar e, por fim, transferidas para a estufa exterior.

**Tabela 7** – Taxas de germinação das 19 sementes (12 em placas; 9 em tubos de ensaio) dos frutos das árvores do Jardim Botânico.

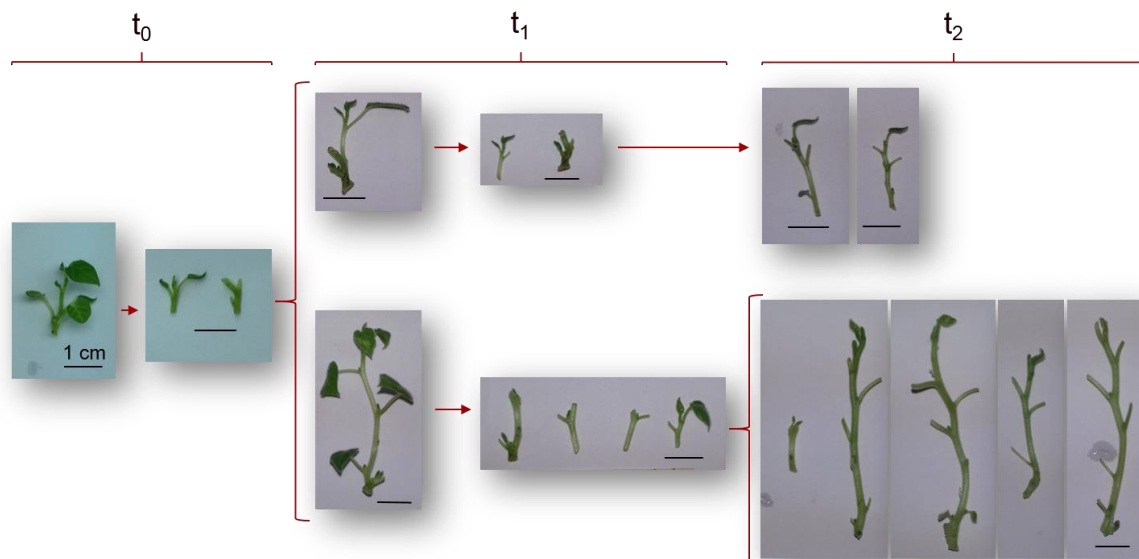
ID	Taxa de Germinação (%)
TJB 0	91,67
TJB 1	75,00
TJB 5	100,00
TJB 6	66,67
TJB 7	58,33
TJB 8	50,00
TJB 9	91,67
TJB 11	75,00
TJB 12	41,67

#### 3.2. Avaliação das taxas de multiplicação, enraizamento e sobrevivência de plantas de diferentes origens

Para avaliar a capacidade de micropropagação das linhas estabelecidas em 2014 em comparação com as linhas estabelecidas em 2018, todas foram sujeitas à avaliação da sua capacidade de multiplicação, enraizamento e sobrevivência à aclimatização.

As plantas de tamarilho foram micropropagadas com sucesso em meio sólido (Tabela 8, Fig. 14), e foram encontradas diferenças significativas entre o número de rebentos obtidos para as linhas clonais estabelecidas em 2014 e em 2018, (Tabela 8; Figs. 15A e 15B). Na Fig. 15B, pode observar-se que para todas as linhas se obtiveram taxas de multiplicação  $\geq 80,00$  %, sendo a linha TJB 12 a que originou uma menor taxa de multiplicação (80,00 %), enquanto a TJB7 permitiu uma taxa de multiplicação de 93,75 %. No entanto, todas as

restantes linhas apresentaram taxas de multiplicação perto de 90,00 %. Na figura 15A, observa-se que as linhas TAM 1, TAM 8, TAM 9, TT e TR, não multiplicaram; apenas as linhas TAM 3 (90,00 %) e TAM 4 (81,82 %) mantêm taxas de multiplicação elevadas e próximas das linhas estabelecidas em 2018. As restantes apresentam taxas de multiplicação que variam desde os 33,33 % (TAM 6) a 75,00 % (TAM 7). Estas diferenças sugerem que a idade das linhas, neste caso cerca de quatro/cinco anos desde o seu estabelecimento, afeta a capacidade de multiplicação das mesmas. Os resultados obtidos para as linhas estabelecidas em 2014 estão de acordo com os dados obtidos por Vujovic *et al.* (2012) em espécies lenhosas (ameixeira, cerejeira e pereira). Neste estudo, após sucessivas subculturas, houve uma diminuição da capacidade de proliferação em todos os genótipos.



**Figura 14** – Micropropagação de gomos axilares ao longo de duas subculturas das linhas estabelecidas em 2014.

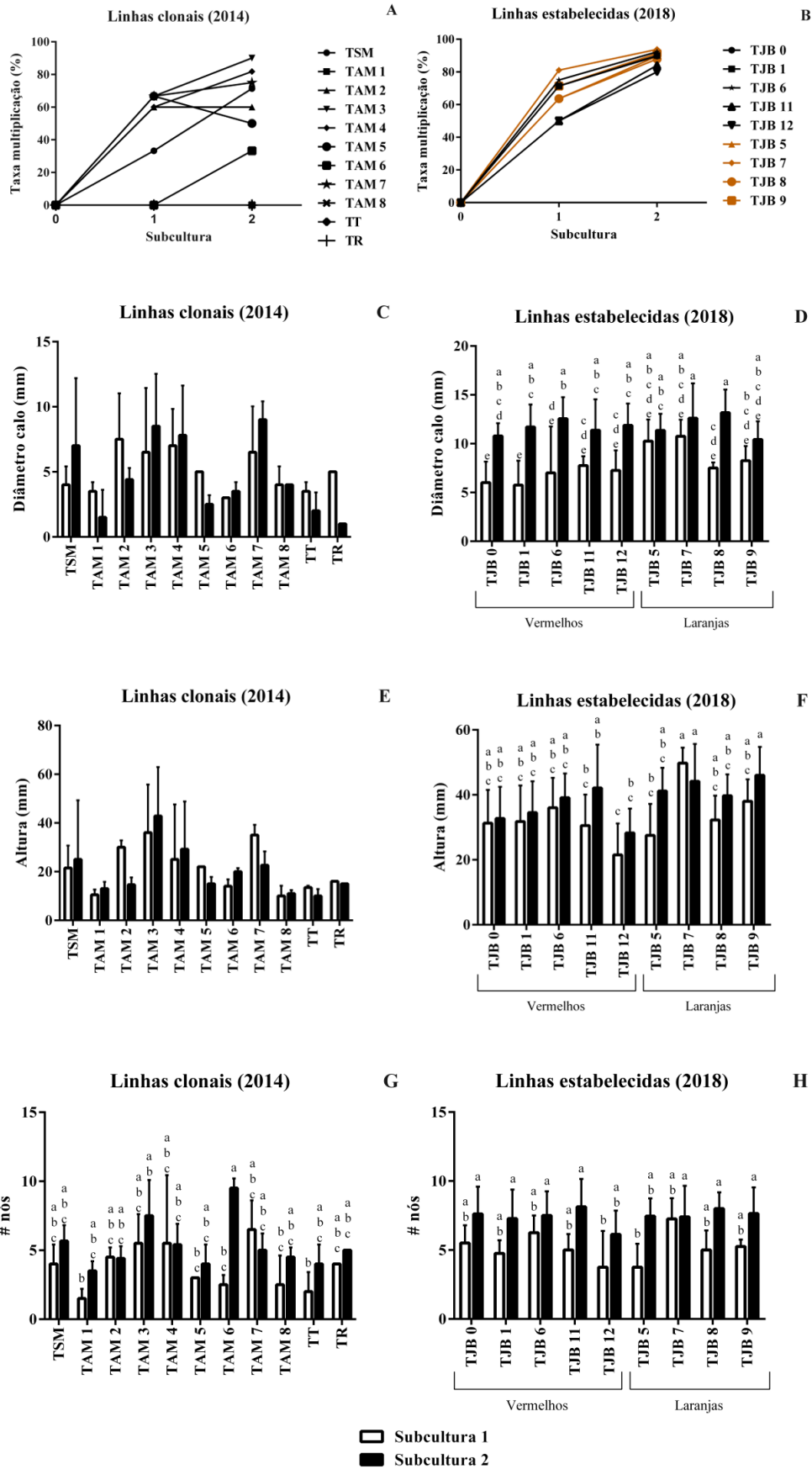
Nas Figs. 15C e 15D, estão representados os diâmetros dos calos basais dos rebentos das linhas clonais de 2014 e das linhas estabelecidas mais recentemente (2018), respetivamente. No caso das linhas clonais de 2014, não existem diferenças significativas no crescimento do calo nem na altura do rebento, quer na mesma subcultura, entre diferentes plantas, quer dentro da mesma planta, em subculturas sucessivas. Nestas linhas (estabelecidas 2014), por vezes o diâmetro do calo aumentou da primeira subcultura para a segunda (TSM, TAM 3, TAM 4, TAM 6, TAM 7), no caso do TAM 8 mantém-se, e nos restantes casos, ocorreu uma diminuição do diâmetro do calo.

**Tabela 8** – Taxas de multiplicação (após 2 subculturas), enraizamento e sobrevivência das plantas obtidas a partir das linhas clonais estabelecidas *in vitro* em 2014 e em 2018. Apenas para as linhas estabelecidas *in vitro* de 2018 foram calculadas taxas de enraizamento e sobrevivência de plantas enraizadas em 3 condições - *in vitro* versus *ex vitro* sem IBA versus *ex vitro* com IBA 0,5 mg/L).

	ID	Multiplificação (%)	Enraizamento (%)			Sobrevivência (%)		
			<i>in vitro</i>	<i>ex vitro</i> (s/ IBA)	<i>ex vitro</i> (IBA)	<i>in vitro</i>	<i>ex vitro</i> (s/ IBA)	<i>ex vitro</i> (IBA)
Linhas estabelecidas 2014	TAM 1	0,00	100,00	-	-	100,00	-	-
	TAM 2	60,00	94,12	-	-	100,00	-	-
	TAM 3	90,00	100,00	-	-	100,00	-	-
	TAM 4	81,82	100,00	-	-	100,00	-	-
	TAM 5	50,00	100,00	-	-	100,00	-	-
	TAM 6	33,33	100,00	-	-	100,00	-	-
	TAM 7	75,00	100,00	-	-	100,00	-	-
	TAM 8	0,00	100,00	-	-	100,00	-	-
	TT	0,00	100,00	-	-	50,00	-	-
	TR	0,00	100,00	-	-	100,00	-	-
	TSM12	71,43	100,00	-	-	100,00	-	-
Linhas estabelecidas 2018	TJB 0	89,74	100,00	-	-	100,00	-	-
	TJB 1	90,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	TJB 5	89,47	76,47	75,00	100,00	100,00	100,00	75,00
	TJB 6	92,31	100,00	70,00	100,00	92,86	100,00	70,00
	TJB 7	93,75	96,67	100,00	81,82	92,59	71,43	100,0
	TJB 8	87,88	100,00	83,33	75,00	100,00	83,33	75,00
	TJB 9	91,30	96,67	87,50	12,50	100,00	100,00	71,43
	TJB 11	84,00	87,50	33,33	66,67	100,00	66,67	33,33
	TJB 12	80,00	83,33	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

\*Nota: TJB 5, TJB 7, TJB 8 e TJB 9 correspondem a linhas de tamarilho laranja e as restantes linhas são linhas de tamarilho vermelho.

No caso da altura dos rebentos (Fig. 15E), em cerca de metade das linhas avaliadas (TSM, TAM 1, TAM 3, TAM 4, TAM 6 e TAM 8), há um maior crescimento dos fitómeros da primeira para a segunda subcultura. Relativamente ao número de nós por rebento (Fig. 15G), a linha TAM 6 foi a única que apresentou diferenças significativas entre as duas subculturas ( $2,50 \pm 0,71$  versus  $9,50 \pm 0,71$ ). Geralmente obteve-se rebentos com maior número de nós na segunda subcultura, exceto para as linhas TAM 2 e TAM 4.



**Figura 15** – Avaliação da propagação ao longo de duas subculturas. A) Taxas de multiplicação dos rebentos – Linhas estabelecidas 2014. B) Taxas de multiplicação dos rebentos – Linhas estabelecidas 2018. C) Diâmetro do calo – Linhas estabelecidas 2014. D) Diâmetro do calo – Linhas estabelecidas 2018. E) Altura dos rebentos – Linhas estabelecidas 2014. F) Altura dos rebentos – Linhas estabelecidas 2018. G) Número de nós – Linhas estabelecidas 2014. H) Número de nós – Linhas estabelecidas 2018. Nos gráficos das imagens B), D), F) e H), os dados encontram-se agrupados pela variedade de tamarilho: vermelhos vs laranjas. Valores apresentados como média  $\pm$  DP ( $1 \leq n \leq 6$ ). Os valores indicados com letras diferentes, no mesmo gráfico, são significativamente diferentes pelo teste ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ). Quando não é apresentado o desvio-padrão, deve-se ao facto de haver apenas uma amostra.

Por outro lado, nas linhas estabelecidas em 2018, verificaram-se diferenças significativas entre as linhas e as subculturas: na subcultura 1, as linhas TJB 0 ( $6,00 \pm 2,16$  cm) e TJB 1 ( $5,75 \pm 2,50$  cm) produziram rebentos significativamente menores comparativamente a todas as linhas da subcultura 2, exceto a TJB 9 ( $8,250 \pm 1,50$  cm). Dentro das mesmas linhas, comparando as subculturas, i.e., da subcultura 1 para a subcultura 2, existem diferenças significativas nas linhas TJB 0, TJB 1, TJB 6 e TJB 8, mas não nas TJB 5, TJB 7, TJB 9, TJB 11 e TJB 12.

O diâmetro do calo aumentou sempre da subcultura 1 para a subcultura 2 (Fig. 15D). No caso da altura dos rebentos (Fig. 15F) não ocorreram diferenças significativas entre as subculturas em nenhum dos rebentos. No entanto, observou-se uma tendência de aumento da altura dos rebentos da primeira para a segunda subcultura, exceto no TJB 7 onde os rebentos da primeira subcultura eram maiores que os da segunda. As linhas TJB 7 ( $49,75 \pm 4,79$  mm *versus*  $44,15 \pm 11,50$  mm) de ambas as subculturas e a segunda subcultura do TJB 9 ( $46,00 \pm 8,77$  mm) apresentaram diferenças significativas (maior altura) em relação à primeira subcultura da TJB 11 ( $30,50 \pm 9,57$  cm), ambas as subculturas da TJB 12 ( $21,50 \pm 9,68$  mm *versus*  $28,25 \pm 7,52$  mm) e primeira subcultura da TJB 5 ( $27,50 \pm 9,75$  mm).

No que diz respeito ao número de nós por rebento (Fig. 15H), observou-se uma tendência de aumento do número de nós da primeira subcultura para a segunda. Existem diferenças significativas das segundas subculturas de TJB 0, TJB 1, TJB 6, TJB 11 ( $8,13 \pm 2,03$ ), TJB 7, TJB 8 TJB 9 ( $7,64 \pm 1,90$ ), que apresentam mais nós do que nas primeiras subculturas nas linhas TJB 12 ( $6,13 \pm 1,73$ ) e TJB 5 ( $7,46 \pm 1,29$ ).

No que diz respeito às linhas estabelecidas em 2018, não se observam diferenças significativas entre linhas de tamarilhos laranjas *versus* vermelhos em nenhum dos fatores avaliados (taxa de multiplicação, diâmetro do calo, altura das plantas e número de nós).

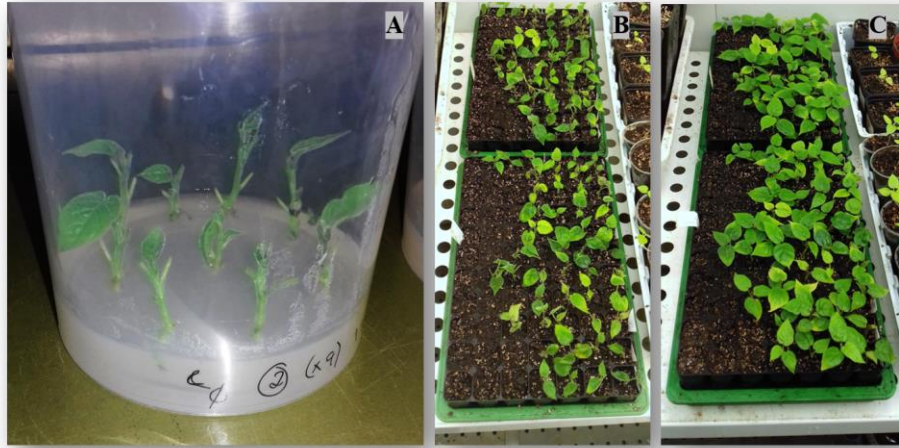
Norton e Norton (1986) relataram, em espécies lenhosas de rosáceas, um aumento na proliferação dos meristemas nas primeiras subculturas, e um declínio gradual em todas as espécies estudadas. Neste mesmo trabalho, ocorreu uma diminuição no comprimento do rebento e tamanho das folhas e aumento da formação de calo após várias subculturas. Este declínio, aparentemente irreversível, pode dever-se a alterações genéticas ou epigenéticas, resultantes de exposições por tempos prolongados a citocininas ou elevadas concentrações de nutrientes ou sacarose. A mesma situação foi relatada por Hegazi *et al.* (2014), na jojoba, para a qual foi registado um aumento da capacidade de proliferação, com mais rebentos e maiores, durante as primeiras subculturas, havendo um declínio a partir da quinta subcultura. Esta diminuição pode estar relacionada com os níveis endógenos de hormona na planta. Há que considerar, no entanto, que o efeito de múltiplas subculturas varia de espécie para espécie Hegazi *et al.* (2014).

De acordo com Madeira *et al.* (2005), na batata-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*), a concentração de BAP não influencia a formação de calo. Todavia, com o aumento da concentração deste regulador de crescimento, observam-se rebentos mais pequenos com maior número de nós e o tamanho dos calos formados na parte basal dos rebentos também diminui. Comparando as linhas clonais de 2014 e linhas de estabelecidas em 2018, é possível verificar que as linhas de 2014 apresentam menor capacidade de propagação. Como é observável, nos gráficos da Fig. 14, todos os gráficos relacionados com as linhas clonais de 2014 apresentam valores menores em relação às linhas recentemente estabelecidas. A baixa taxa de multiplicação reflete-se na altura e número de nós do rebento. Observa-se também um menor diâmetro do calo basal. Embora não tenham sido avaliadas diferentes concentrações de BAP, como em Madeira *et al.* (2005), as linhas clonais 2014 apresentam menores valores das taxas de multiplicação em comparação com as linhas estabelecidas 2018. Note-se que as linhas clonais 2014, se encontram em meio de multiplicação (com BAP) desde 2014 (cinco anos). Pelo que é necessário ter este factor em conta.

### **3.2.1. Enraizamento**

Uma vez que as linhas estabelecidas em 2014 apresentaram baixas taxas de multiplicação, não havendo plantas suficientes, não foram sujeitas a avaliação de enraizamento *ex vitro*. Na figura 16 são apresentados rebentos a enraizar *in vitro* e *ex vitro* com aclimatização em simultâneo, e na figura 17 as plântulas e raízes resultantes de cada tratamento. Nas figuras 18 e 19 são apresentados os resultados da avaliação das taxas de

enraizamento registadas *in vitro* para as linhas estabelecidas em 2014 e as linhas estabelecidas em 2018, as taxas de enraizamento *in vitro versus ex vitro* sem IBA e *versus ex vitro* com IBA.



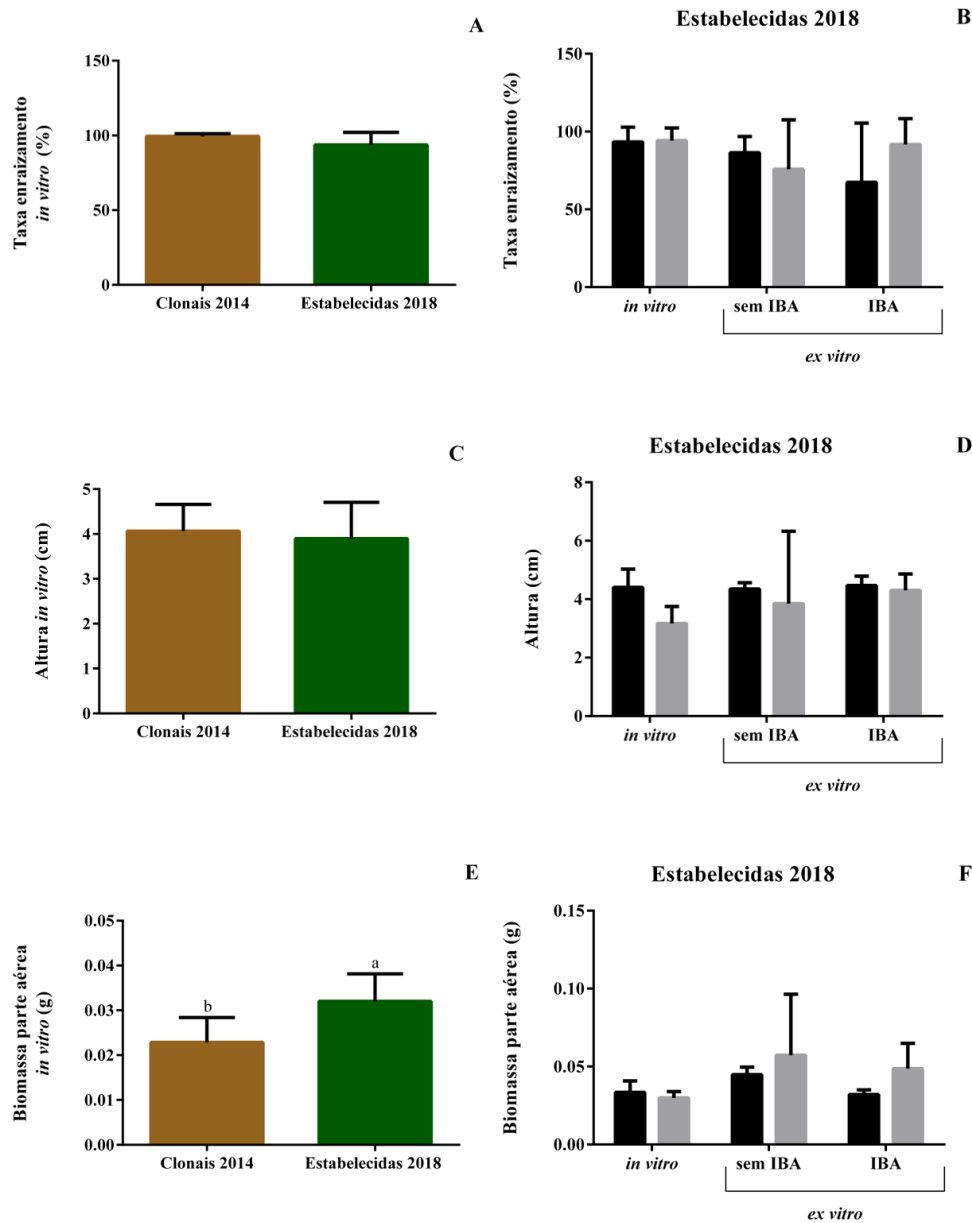
**Figura 16** – Rebentos em enraizamento. A) Enraizamento *in vitro*. B) e C) Enraizamento *ex vitro* e aclimatização simultânea.



**Figura 17** – Plântulas onde são visíveis as raízes desenvolvidas após os diferentes ensaios de enraizamento. A) Enraizamento *in vitro*. B) Enraizamento *ex vitro* sem IBA. C) Enraizamento *ex vitro* com IBA.

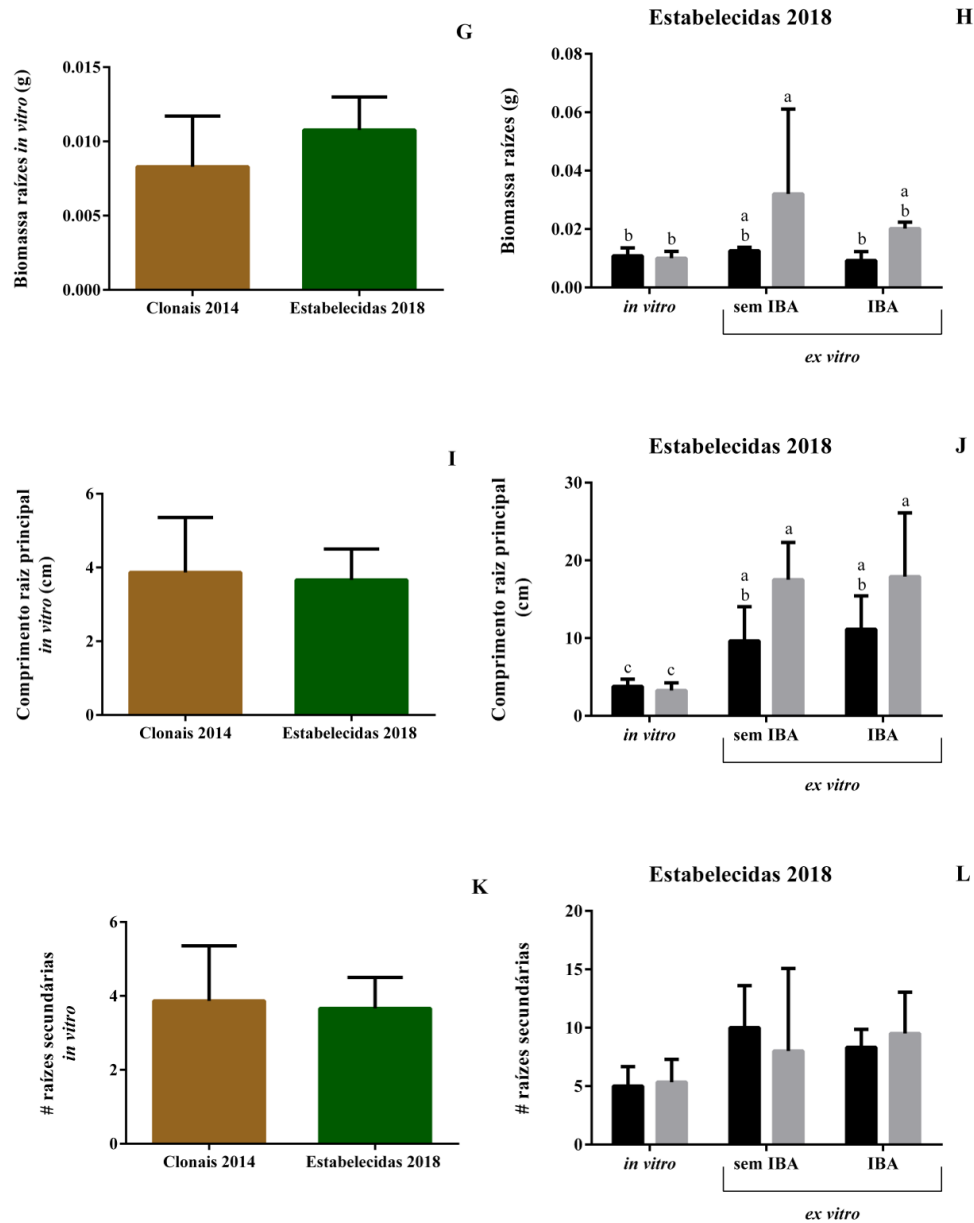
Quanto às taxas de enraizamento (Fig. 18A), observa-se uma ligeira diferença, em que as linhas estabelecidas em 2018 ( $93,73 \pm 8,35$  g peso seco) apresentam menores taxas de enraizamento em relação às linhas estabelecidas em 2014 ( $99,47 \pm 1,78$  g peso seco), apesar de não significativas. O mesmo acontece para a altura da plântula (parte aérea), comprimento da raiz principal e número de raízes secundárias (Figs. 18C, 19I e 19K). No que respeita à biomassa da parte aérea (Fig. 18E), a tendência inverte-se, e as plantas das linhas estabelecidas em 2018 apresentam um valor significativamente maior ( $0,032 \pm 0,01$  g de peso seco) do que as linhas clonais de 2014 ( $0,023 \pm 0,01$  g de peso seco). A biomassa das raízes

mantém-se superior nas plantas das linhas estabelecidas em 2018, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa. Assim, ao contrário do que foi observado, em que a idade de estabelecimento das culturas influencia a capacidade de propagação (Vujovic *et al.*, 2012), parece não ter influência na capacidade de enraizamento.



**Figura 18** – Avaliação do enraizamento de rebentos das linhas estabelecidas em 2014 *versus* linhas estabelecidas em 2018. Apenas para as linhas estabelecidas em 2018 foram analisados os parâmetros relativos ao enraizamento *in vitro versus ex vitro* sem IBA *versus ex vitro* com IBA, para tamarilhos de linhas laranjas *versus* vermelhos. A) e B) Taxas de enraizamento. C) e D) Altura das plantas. E) e F) Biomassa da parte aérea. Valores apresentados como média  $\pm$  DP ( $1 \leq n \leq 6$ ). Os valores indicados com letras diferentes, no mesmo gráfico, são significativamente diferentes pelo teste t (lado esquerdo) e ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ) (lado direito). Quando não é apresentado o desvio-padrão, deve-se ao facto de haver apenas uma amostra.





**Figura 19** – Avaliação do enraizamento (Continuação da figura 18). Avaliação do enraizamento de rebentos das linhas estabelecidas em 2014 *versus* linhas estabelecidas em 2018. Apenas para as linhas estabelecidas em 2018 foram analisados os parâmetros relativos ao enraizamento *in vitro* *versus ex vitro* sem IBA *versus ex vitro* com IBA, para tamarilhos de linhas laranjas *versus* vermelhos. G) e H) Biomassa raízes. I) e J) Comprimento da raiz principal. K) e L) Número de raízes secundárias. Valores apresentados como média  $\pm$  DP ( $1 \leq n \leq 6$ ). Os valores indicados com letras diferentes, no mesmo gráfico, são significativamente diferentes pelo teste t (lado esquerdo) e ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ) (lado direito). Quando não é apresentado o desvio-padrão, deve-se ao facto de haver apenas uma amostra.

Como apenas nas linhas estabelecidas em 2018 foram testados os enraizamentos *ex vitro* (Figs. 16B e 16C), doravante, as plantas serão divididas em tamarilhos laranjas e vermelhos, das quais foram selecionadas as linhas TJB 5, TJB 7 e TJB 9 (laranjas) e as TJB 1,

TJB 11 e TJB 12 (vermelhas). Na figura 18 é possível observar as diferenças entre os parâmetros analisados nas plantas e raízes obtidas após o ensaio de enraizamento *in vitro*, *ex vitro* sem IBA e *ex vitro* com IBA. Assim, na figura 18B observam-se diferenças, embora não significativas, entre os enraizamentos *in vitro* e *ex vitro*, sendo superior no *in vitro*, não havendo diferenças significativas entre as linhas de tamarilhos vermelhos ( $94,17 \pm 8,12$  %) e linhas de tamarilho laranja ( $93,30 \pm 9,52$  %).

Quanto ao enraizamento *ex vitro*, as linhas de tamarilho laranja responderam melhor ao enraizamento sem IBA ( $86,46 \pm 10,42$  %), enquanto que as linhas de tamarilho vermelho responderam melhor ao enraizamento com IBA ( $91,67 \pm 16,67$  %). Segundo Sunandakumari *et al.* (2004), em *Mentha piperita*, o enraizamento *ex vitro* também é eficaz, na presença de IBA ou não, uma vez que as percentagens de sobrevivência são elevadas. De acordo com Singh e Agarwal (2016), na jojoba, são alcançadas taxas de enraizamento similares (e elevadas) *ex vitro* e *in vitro*, tal como aconteceu neste trabalho com o tamarilho. Também é observado, tal como no trabalho de Singh e Agarwal (2016), que a utilização do IBA é benéfica no enraizamento.

No que respeita à altura das plantas (Fig. 18D), não se verificaram diferenças significativas. Todavia, existem diferenças entre os tamarilhos vermelhos, cujas plantas obtidas por enraizamento *in vitro* apresentam uma menor altura ( $3,17 \pm 0,59$  cm) comparativamente à maior altura registada para as plantas enraizadas *ex vitro* com IBA ( $4,30 \pm 0,57$  cm) e cujo valor se aproximou do registado para os tamarilhos laranja. Dentro das linhas laranja não se observaram diferenças significativas resultantes do tipo de tratamento.

Quanto à biomassa da parte aérea (Fig 18F) foi maior nos enraizamento *ex vitro*, nomeadamente no enraizamento sem IBA. Mais uma vez, o tipo de enraizamento afetou o desenvolvimento da planta. Ao contrário do que se verificou para o parâmetro altura, para as linhas de tamarilho vermelho, as plantas enraizadas *ex vitro* sem IBA apresentaram maior biomassa. No que respeita a biomassa da raiz (Fig. 18H), mais uma vez as plantas obtidas por enraizamento *ex vitro* sem IBA apresentaram valores superiores, tendo-se observado diferenças significativas das linhas de tamarilho vermelho do enraizamento *ex vitro* sem IBA ( $0,03 \pm 0,03$  g), em relação às de tamarilho laranja do enraizamento *ex vitro* com IBA ( $0,01 \pm 0,00$  g), e ambas as variedades, laranja ( $0,01 \pm 0,00$  g) e vermelha ( $0,01 \pm 0,00$  g) do enraizamento *in vitro*.

Os dados relativos ao comprimento da maior raiz adventícia podem ser observados na figura 19J, onde mais uma vez se destaca o enraizamento *ex vitro*. O enraizamento *in vitro* de ambas as linhas apresenta diferenças significativas com ambas as variedades de ambos os enraizamentos *ex vitro*, sendo substancialmente menor: *in vitro* laranja ( $3,78 \pm 0,92$  cm) e vermelho ( $3,25 \pm 0,98$  cm) *versus ex vitro* sem IBA laranja ( $9,63 \pm 4,41$  cm) e vermelho ( $17,50 \pm 4,80$  cm) *versus ex vitro* com IBA laranja ( $11,13 \pm 4,32$  cm) e vermelho ( $17,90 \pm 8,2$  cm). Dentro dos enraizamentos *ex vitro* não existem diferenças entre as variedades, *i.e.*, o comprimento da raiz principal da variedade laranja/vermelha é semelhante no enraizamento *ex vitro* sem/com IBA. No entanto, dentro do mesmo enraizamento *ex vitro* há diferenças entre as linhas de tamarilho vermelho e as de laranja, onde a variedade vermelha apresenta uma raiz principal muito maior em ambos os enraizamentos do que os laranjas.

Mais uma vez, no número de raízes secundárias da maior raiz adventícia (Fig. 19 L) no enraizamento *ex vitro* é superior ao do enraizamento *in vitro*, todavia sem que as diferenças sejam significativas. Dentro do enraizamento *ex vitro* sem IBA e com IBA, as variedades apresentam comportamentos opostos, *i.e.*, no enraizamento *ex vitro* sem IBA os tamarilhos laranjas apresentam mais raízes secundárias do que os vermelhos, e no enraizamento *ex vitro* com IBA, observa-se o contrário, o maior número de raízes secundárias observou-se para os tamarilhos vermelhos.

Segundo Singh e Agarwal (2016), o sistema radicular desenvolvido *ex vitro* é diferente do desenvolvido *in vitro*, sendo o primeiro mais adequado para a sobrevivência e estabelecimento de plantas quando comparado com o enraizamento *in vitro*. McClelland *et al.* (1990) sustentam que devido à contínua disponibilidade de nutrientes, humidade e oxigénio nas condições *in vitro*, as plantas não sentem necessidade de desenvolver nem o xilema nem o floema secundário para melhorar a condução; no trabalho de McClelland e colaboradores as raízes formadas *in vitro* apresentavam-se pequenas, subdesenvolvidas e com poucas raízes secundárias, podendo apresentar menor biomassa, tal como acontece no presente trabalho no tamarilho. O facto de o enraizamento ser *ex vitro*, obriga as plantas a desenvolver métodos para conseguir conduzir os elementos que necessita para se desenvolver, nomeadamente, desenvolver o sistema vascular secundário. Isto pode levar a um maior desenvolvimento da planta, refletindo-se nos valores de biomassa superiores e maior desenvolvimento do sistema radicular, tal como observado nos resultados.

### 3.2.2. Aclimatização

As plantas provenientes do enraizamento *ex vitro* foram colocadas na estufa em meados de Março de 2019, duas semanas antes das plantas provenientes do enraizamento *in vitro*. A medição dos parâmetros fisiológicos e morfológicos foi realizada em meados de Junho de 2019. Nas figuras 20 e 21, observam-se plantas no final da aclimatização, e no dia em que foi avaliada a sobrevivência, respectivamente.

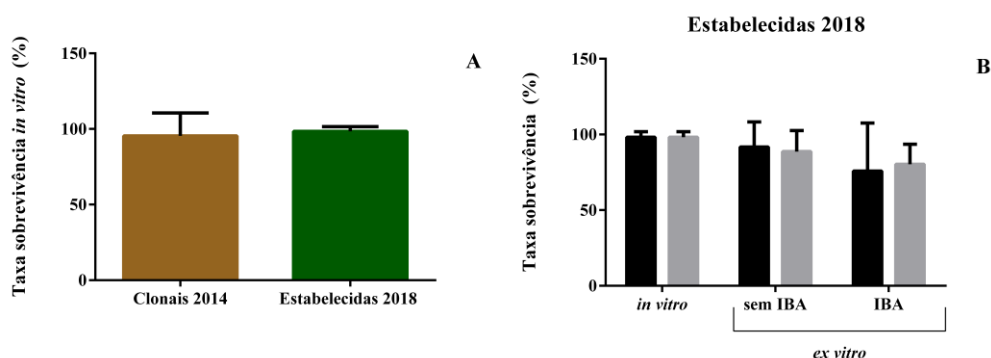


**Figura 20** – Aclimatização das plantas cujo enraizamento foi realizado *in vitro*. A) Plântulas no início da aclimatização. B) Plantas no final da aclimatização.



**Figura 21** – Plantas sobreviventes à aclimatização: medição da fluorescência, potencial hídrico e biomassas (parte aérea e raízes). A) Plantas provenientes do enraizamento *in vitro*. B) Plantas provenientes do enraizamento *ex vitro* sem IBA. C) Plantas provenientes do enraizamento *ex vitro* com IBA.

Na figura 22A e na Tabela 8, pode verificar-se que a maior parte das plantas obtidas do enraizamento *in vitro* sobreviveu após a aclimatização, *i.e.*, apresentam uma taxa de sobrevivência de 100 %, excetuando o TJB 6 e TJB 7 das linhas estabelecidas em 2018, com 92,86 % e 92,59 % de sobrevivência, respetivamente e TT (50,00 %) das linhas estabelecidas em 2014. Não se encontraram diferenças significativas na sobrevivência de plantas obtidas pelo enraizamento *in vitro*. Na figura 22B, também não se verificam diferenças significativas entre a sobrevivência de genótipos laranjas e vermelhos, nem entre plântulas obtidas de enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* independentemente do uso de IBA ou não. Apesar de não ser significativa, observam-se ligeiras diferenças entre as plantas de enraizamento *in vitro*, seguidas das de *ex vitro* sem IBA, e por último *ex vitro* com IBA. Segundo Singh e Agarwal (2016), o enraizamento *ex vitro* sem PGRs é possível, pois uma vez a auxina seja essencial para a indução do enraizamento (podendo ser suficiente a endógena), pode não ser necessário para o crescimento das raízes, e a sua presença pode ser prejudicial a ponto de inibir o crescimento da raiz.



**Figura 22** – Taxas de sobrevivência. A) Plântulas obtidas de enraizamento *in vitro*: linhas estabelecidas 2014 versus linhas estabelecidas 2018. B) Plântulas obtidas de enraizamento *in vitro* versus *ex vitro* sem IBA vs *ex vitro* com IBA das linhas estabelecidas 2018. Valores apresentados como média  $\pm$  DP ( $4 \leq n \leq 6$ ). Foi realizado o teste ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ). Quando não são apresentadas letras é indicativo de que não há diferenças significativas.

Desde a colocação em estufa, até que foram registados os parâmetros morfológicos e fisiológicos, as plantas foram sujeitas a altas variações de temperatura e humidade. Segundo o IPMA (2019), o mês de Março foi classificado como quente e seco, com temperaturas superiores às normais e precipitação menor que o normal. Mais ainda, destaca-se a ocorrência de uma onda de calor entre 22 e 31 de Março, altura em que a temperatura na estufa exterior ultrapassou os 50 °C. Já no mês de Abril houve grandes variações de temperatura, havendo

semanas com valores de temperaturas entre 5 a 7 °C abaixo do normal, e semanas em que os valores da temperatura foram perto de 8 °C acima do normal. O mês de Maio de 2019 foi também anormalmente quente e extremamente seco, com períodos de vários dias com temperaturas acima dos 30 °C. Em Junho, na primeira quinzena foram registadas altas amplitudes de temperatura com oscilações de temperatura de 5,6 °C e de 8 °C, abaixo e acima do normal, respetivamente. Apesar de um fornecimento regular de água, estas oscilações de temperaturas e humidade no ar a que as plantas estiveram sujeitas afetaram o seu desenvolvimento, uma vez que o tamarilho tem um crescimento ótimo entre os 20 e os 25 °C (Núcleo Ambiental SAS, 2015). Mais ainda durante várias semanas, as plantas encontraram-se sem proteção de uma zona de sombra. O tamarilho é uma planta com sensibilidade elevada à intensidade solar (Núcleo Ambiental SAS, 2015) e a luz solar a que estiveram expostos pode ter danificado as folhas, afetando a disponibilidade de clorofila, a capacidade de fotossintetizar e, conseqüentemente o seu desenvolvimento. Este fator, aliado com as elevadas temperaturas e baixa humidade, teve repercussões no desenvolvimento da planta e naturalmente, pode ter influência nos parâmetros medidos. Nas figuras 20 e 21 é possível observar o impacto que estas condições tiveram nas plantas, nomeadamente na cor das folhas.

Na figura 23, estão representados os aspetos morfológicos das raízes resultantes dos diferentes tratamentos e variedades. As plantas sobreviventes das linhas estabelecidas em 2018, foram sujeitas à avaliação de parâmetros fisiológicos e morfológicos estando os dados obtidos expressos nas figuras 24A e 24B, no que diz respeito aos parâmetros da fluorescência da clorofila. Segundo Braga (2015), as plantas de linhas de tamarilho vermelho aclimatizadas apresentam valores de fluorescência efetiva de aproximadamente 0,80. A figura 24A diz respeito ao rendimento máximo do fotossistema II. As plantas de linhas de tamarilho laranja provenientes do enraizamento *ex vitro* com IBA ( $0,66 \pm 0,03$ ) possuem fluorescência máxima significativamente menor do que ambas as plantas provenientes do enraizamento *in vitro*. Embora sem diferenças significativas, as linhas de tamarilhos vermelhos apresentam maior fluorescência. Já a fluorescência efetiva ( $\Phi_{PSII}$ ) (Fig. 24B) apresenta valores diferentes, mas não significativos: as plantas provenientes do enraizamento *in vitro* continuam a apresentar valores superiores, e as plantas do enraizamento *ex vitro* com IBA continuam os menores. Da mesma maneira, e de forma mais atenuada, os tamarilhos vermelhos continuam a apresentar maior fluorescência. Isto pode dever-se ao facto de as folhas das árvores dos tamarilhos vermelhos serem mais verdes, e como tal, apresentarem mais clorofila; já as dos laranjas são mais amareladas (Sánchez-Veja, 1992), ou seja, possuem menos clorofila, explicando os

menores valores de fluorescência. Observa-se também um decréscimo de aproximadamente 50 % da eficiência máxima para a efetiva. Na figura 21 podem observar-se as plantas provenientes dos três tipos de enraizamento, e é perceptível que a parte aérea das plantas se encontra subdesenvolvida, e as folhas amareladas. Isto pode dever-se às condições de temperatura e humidade a que foram sujeitas uma vez colocadas na estufa exterior.



**Figura 23** – Raízes de plantas de diferentes variedades, provenientes de enraizamentos diferentes. Linha superior – variedade laranja. A) *In vitro*. B) *Ex vitro* sem IBA C) *Ex vitro* com IBA. Linha inferior – variedade vermelha. D) *In vitro*. E) *Ex vitro* sem IBA. F) *Ex vitro* com IBA.

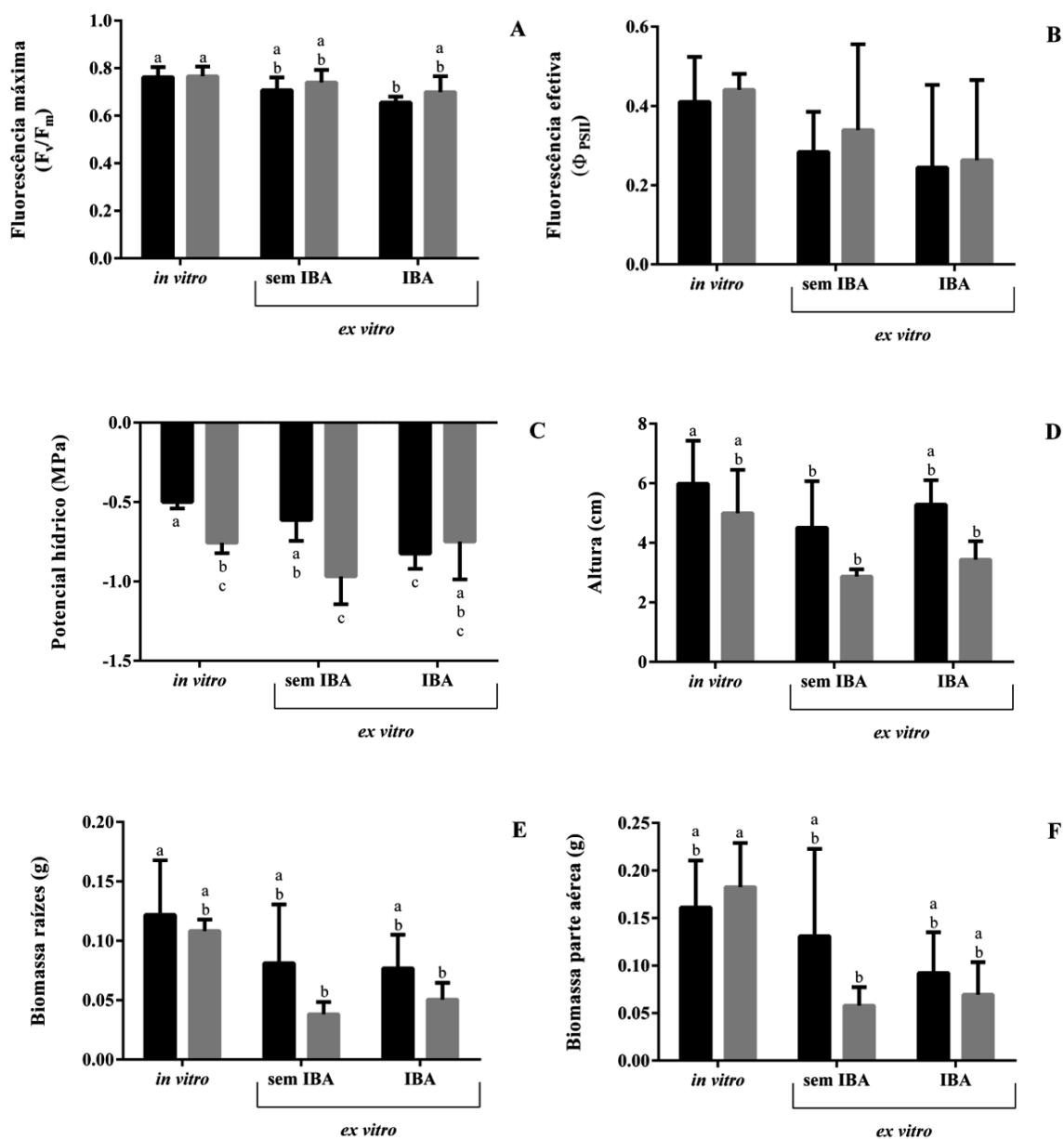
Quanto ao potencial hídrico (Fig. 24C), as linhas de tamarillo laranja das plantas provenientes do enraizamento *in vitro* apresentaram diferenças significativas, com um potencial menos negativo ( $-0,50 \pm 0,04$  MPa), em relação aos vermelhos *in vitro* ( $-0,76 \pm 0,07$  MPa) e *ex vitro* sem IBA ( $-0,97 \pm 0,18$  MPa), e laranjas *ex vitro* com IBA ( $-0,83 \pm 0,10$  MPa). Existem também diferenças significativas nos tamarillos laranja entre os tratamentos *ex vitro*, sendo o tratamento sem IBA ( $-0,61 \pm 0,13$  MPa) menos negativo que o tratamento com IBA ( $-0,83 \pm 0,10$  MPa). De acordo com Braga (2015), as plantas de linhas de tamarillo vermelho

que não se encontram em stress hídrico, apresentam valores de potencial hídrico ( $\psi_w$ )  $\geq -0,5$  MPa. Neste trabalho, todos os valores do potencial hídrico ( $\psi_w$ ) foram  $\leq -0,5$  MPa, sugerindo que todas as plantas, independentemente da linha ou ensaio de enraizamento, se encontram longe do estado hídrico normal. Isto pode ter sido condicionado pelas condições climatológicas a que as plantas foram sujeitas na estufa de exterior.

Relativamente à altura das plantas (Fig. 24D), observam-se diferenças significativas entre as linhas laranja obtidas *in vitro* ( $5,98 \pm 1,45$  cm), com as plantas obtidas de *ex vitro* sem IBA, quer as laranjas ( $4,51 \pm 1,60$  cm) quer as vermelhas ( $2,87 \pm 0,24$  cm) e com as plantas obtidas *ex vitro* com IBA vermelhas ( $3,44 \pm 0,62$  cm). Entre os tratamentos observam-se diferenças entre os tratamentos, em que as plantas enraizadas *in vitro* são maiores, seguidas das *ex vitro* com IBA, e por último, as *ex vitro* sem IBA. De acordo com Acosta-Quezada *et al.* (2016), o tamarilho apresenta um crescimento rápido nos primeiros seis a oito meses de desenvolvimento, e há um significativo crescimento vegetativo no comprimento do caule e desenvolvimento de folhas. Para esta espécie, o tempo necessário para chegar a um determinado comprimento, ou atingir um certo número de nós depende da cultivar/variedade, técnica de cultivo (ex: poda), bem como das condições ambientais. Neste estudo, dentro das variedades existe uma tendência para que as plantas das linhas de tamarilho laranja sejam maiores que as linhas de tamarilho vermelho.

A figura 24E mostra a biomassa das raízes, e os resultados indicam que ocorreram diferenças significativas entre as linhas de tamarilho laranja enraizadas *in vitro* ( $0,12 \pm 0,05$  g) e as linhas de tamarilho vermelho enraizadas *ex vitro* sem IBA ( $0,04 \pm 0,01$  g) e com IBA ( $0,05 \pm 0,01$  g). Observa-se que plantas obtidas de enraizamento *in vitro* apresentam maior biomassa na raiz, seguida das *ex vitro* sem IBA e finalmente *ex vitro* com IBA. Dentro das variedades, há uma tendência de maior biomassa nas raízes na variedade laranja em relação à vermelha. Por fim, na figura 24F, estão expressos os dados relativos à biomassa da parte aérea. Apenas foram encontradas diferenças significativas entre as linhas de tamarilho vermelho obtidas de enraizamento *in vitro* em relação às de tamarilho vermelho obtidas de enraizamento *ex vitro* sem IBA, que apresentam uma biomassa muito menor. Mais uma vez, as plantas obtidas de *in vitro* apresentam biomassas maiores, seguidas das de enraizamento *ex vitro* sem IBA e finalmente *ex vitro* com IBA. Dentro das plantas obtidas de enraizamento *ex vitro* mantém-se a mesma tendência de a variedade laranja apresentar maior biomassa. Pelo contrário, nas obtidas de *in vitro* a variedade vermelha apresenta maior biomassa.





**Figura 24** – Avaliação do desenvolvimento entre plantas sobreviventes de tamarilho laranjas *versus* vermelhos obtidos de três tipos de enraizamento: *in vitro versus ex vitro sem IBA versus ex vitro com IBA*. A) Rendimento máximo de fluorescência da clorofila *a* do fotossistema II. B) Eficiência fotoquímica do fotossistema II. C) Potencial hídrico. D) Comprimento da parte aérea. E) Biomassa das raízes. F) Biomassa da parte aérea. Valores apresentados como média  $\pm$  DP ( $4 \leq n \leq 6$ ). Os valores indicados com letras diferentes, no mesmo gráfico, são significativamente diferentes pelo teste ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ). Quando não são apresentadas letras é indicativo de que não há diferenças significativas.

Quanto aos valores de biomassa, mais uma vez, as plantas obtidas do enraizamento *in vitro* possuem biomassas superiores, quer nas raízes, quer na parte aérea. De acordo com Borkowska (2001), plântulas sujeitas a enraizamento *ex vitro*, apresentam sistemas de raízes maiores do que as enraizadas *in vitro*, o que se reflete em maiores valores de biomassa. A biomassa está diretamente relacionada com a fotossíntese, que por sua vez está diretamente dependente da clorofila (Bouman e Sylliboy, 2012). A clorofila encontra-se predominantemente nas células do mesófilo foliar, sendo responsável pela cor verde das folhas. Como podemos observar na figura 21, as folhas das plantas encontram-se bastante amareladas. Todavia, as folhas das plantas obtidas do enraizamento *in vitro*, são as que se apresentam mais verdes. Isto corrobora a sua maior capacidade fotossintética, e como tal, maiores biomassas das raízes e parte aérea.

### **3.3. Avaliação da qualidade dos frutos**

#### **3.3.1. Parâmetros biométricos, físico-químicos e análise sensorial**

Os dados relativos à avaliação da qualidade dos frutos durante o amadurecimento encontram-se nas figuras 25-27, e no estado maduro na figura 28.

Quanto ao acompanhamento do amadurecimento, com recolha de frutos em intervalos de três semanas, durante três meses, verifica-se que os valores de diâmetro (Fig. 25A), comprimento (Fig. 25B) e também o peso (Fig. 25D), se mantêm semelhantes desde a primeira à última recolha, apesar de ligeiras oscilações durante a maturação, quer nos frutos vermelhos, quer no laranja. Segundo Heatherbell *et al.* (1982), o desenvolvimento no tamarilho é diferente do usual, uma vez que normalmente, o desenvolvimento do fruto é dividido em diferentes períodos, nomeadamente, divisão celular, crescimento celular e maturação. A taxa de crescimento varia entre estas fases, sendo, por norma, mais lenta durante a maturação. Todavia, no tamarilho, é bastante invulgar, cessando o crescimento cerca de dez semanas antes da maturação estar completa, ou seja, o fruto atinge o seu crescimento máximo por volta das quinze semanas de desenvolvimento (Heatherbell *et al.*, 1982).

O ano de 2018 foi ligeiramente diferente do habitual em Portugal continental (IPMA): no inverno, a temperatura foi ligeiramente inferior ao normal e a precipitação foi muito inferior à de outros anos; já na primavera, a temperatura foi ligeiramente inferior. No entanto, a precipitação foi superior em 200 % em relação ao normal; no verão, a temperatura foi

ligeiramente superior ao normal, e a precipitação foi muito próxima do valor normal, tendo sido o Julho mais frio desde 2000 e o de Agosto o mais quente desde 2003, onde ocorreu uma onda de calor de 1 a 6 de agosto. Por fim, no outono, a temperatura e a precipitação foram superiores ao habitual, tendo passado três ondas de calor, sido o Setembro mais quente e mais seco desde há 30 anos. Foi também neste período que ocorreu a passagem da tempestade Leslie, no dia 14 de Outubro, que originou ventos muito fortes, nomeadamente na Figueira da Foz e em Coimbra (IPMA, 2019).

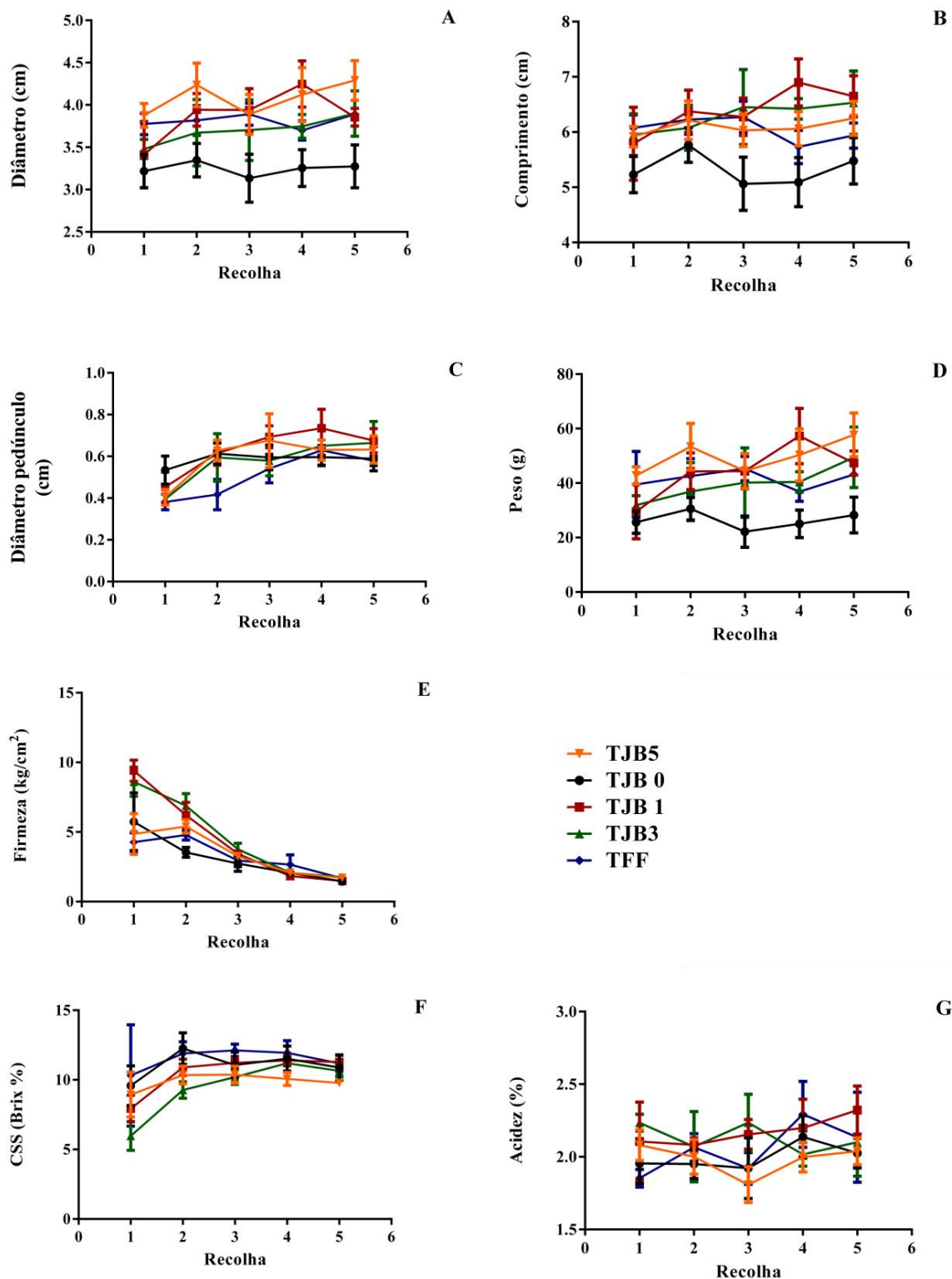
Estes dados são relevantes, uma vez que, a floração no tamarilho decorre, normalmente, entre Junho a Outubro e a frutificação começa em Outubro e dura até Janeiro, altura em que se recolhem os frutos. No entanto, aquando da primeira recolha, a 28 de Setembro de 2018, já não havia nenhuma flor nas árvores, e os frutos já se apresentavam desenvolvidos (ainda que com tonalidade verde).

Segundo Heatherbell *et al.* (1982), a primeira mudança de cor ocorre ao fim de quinze semanas. Pela análise da figura 26, podemos ver que a primeira alteração na cor ocorreu na segunda recolha, ou seja, cerca de três semanas após a primeira. Isto leva a especular que, aquando a primeira recolha, os frutos já teriam, pelo menos doze semanas, explicando assim a baixa ou nula alteração nos comprimento, diâmetro e peso.

Na figura 25C, observa-se um aumento do diâmetro do pedúnculo entre a primeira e segunda recolhas, tendo os valores estabilizado a partir desta. O diâmetro aumenta quando diminui ou cessa por completo a floração, altura na qual, o crescimento do fruto ocorre. O fornecimento de água e nutrientes para os frutos em crescimento é limitado pela área vascular do pedúnculo, assim, observa-se um aumento do diâmetro do pedúnculo à medida que o fruto vai crescendo, devido ao maior aporte de nutrientes e enzimas, estabilizando o crescimento do pedúnculo na mesma altura em que o fruto cessa o crescimento (Anoop,2012).

A figura 25E mostra que a firmeza dos frutos vai diminuindo ao longo das recolhas, quer nos frutos vermelhos, quer no laranja. O amolecimento dos frutos deve-se à atividade enzimática durante o processo de amadurecimento, nomeadamente das enzimas envolvidas na deterioração da parede celular e processos bioquímicos que envolvem a hidrólise de pectinas e amido por enzimas como as hidrolases, pectinaesterases e poligalacturonases (Ruelas-Chacon *et al.*, 2017).

Em relação ao conteúdo de sólidos solúveis (CSS) (Fig. 25F), verificou-se que houve



**Figura 25** – Avaliação da qualidade dos frutos – recolha durante o amadurecimento. Parâmetros biométricos: A) Diâmetro do fruto. B) Comprimento do fruto. C) Diâmetro do pedúnculo. D) Peso do fruto. Análise sensorial: E) Firmeza do fruto. Parâmetros físico-químicos: F) Conteúdo de sólidos solúveis. G) Acidez. Os frutos considerados para o estudo eram das árvores do Jardim Botânico: TJB 0 – Vermelho; TJB 1 – Vermelho; TJB 3 – Vermelho; TJB 5 – Laranja; e da Figueira da Foz: TFF – Vermelho.

um aumento gradual durante o amadurecimento, tendo os valores estabilizado a partir da terceira recolha. Este conteúdo indica a quantidade de sólidos por 100 g de fruta, que se encontram dissolvidos na polpa como açúcares e ácidos orgânicos, apresentando uma correlação altamente positiva com o teor de açúcar na amostra. Segundo Heatherbell *et al.* (1982), duas semanas após o fruto atingir o tamanho máximo, o CSS aumenta rapidamente, atingindo o pico dezoito semanas após o início da frutificação. Tendo em conta que, aquando da primeira recolha, se especula que os frutos já teriam doze semanas, na terceira recolha, os frutos já teriam dezoito semanas, período no qual o CSS estabilizou.

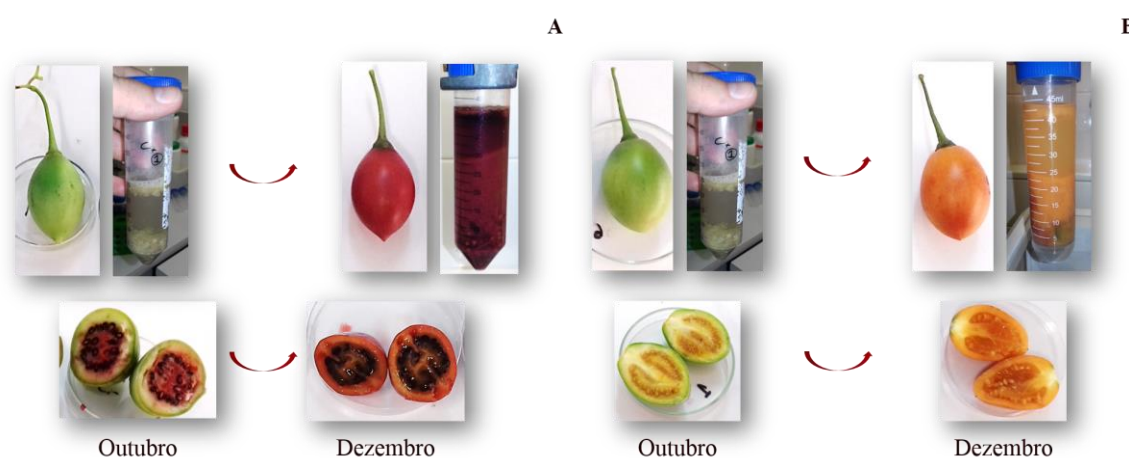
Os dados sobre a acidez dos frutos não foram muito conclusivos (Fig. 25G), uma vez que os valores não seguem um padrão, como seria de esperar segundo Heatherbell *et al.* (1982). No caso da acidez seria expectável um aumento da acidez no início, e uma diminuição durante as recolhas seguintes. A medição destes valores pode ter sido influenciada pelas condições climáticas a que o fruto esteve sujeito, mas também por erros laboratoriais associados à metodologia de medição, necessitando os dados de ser comprovados por testes ulteriores.

As alterações na cor do epicarpo ao longo das cinco recolhas, durante o amadurecimento, podem visualizar-se na figura 26. Na sequência de cima (Fig. 26A), é possível observar a gradação de cor durante o amadurecimento de tamarilhos vermelhos; já na de baixo (Fig. 26B), pode observar-se a gradação de cor de tamarilhos laranjas.



**Figura 26** – Gradação de cor do exocarpo durante a maturação dos tamarilhos, ao longo das cinco recolhas. A) Tamarilhos vermelhos. B) Tamarilhos laranjas.

Na figura 27 é apresentada a diferença entre os tamarilhos na primeira recolha (Outubro – não maduros) e na última recolha (Dezembro – maduros) – Fig. 27A vermelhos; Fig. 27B laranjas. Nas imagens de Outubro, são apresentados tamarilhos não maduros, verdes e com pouca polpa após a centrifugação para a medição da acidez; nas imagens de Dezembro do esquema, observam-se os tamarilhos na última recolha, já maduros, incluindo a grande diferença na maior quantidade de polpa e sumo. Esta evolução está ligada com a firmeza inversamente proporcional, uma vez que, quanto menor a firmeza, maior foi a deterioração da parede celular e degradação dos açúcares, e como tal, mais polpa e sumo após a centrifugação.



**Figura 27** – Maturação do tamarilho. Alterações no exterior e interior do tamarilho – tubo de ensaio com solução trifásica após centrifugação. A) Tamarilho vermelho. B) Tamarilho laranja.

Os dados relativos à avaliação da qualidade dos frutos recolhidos no estado maduro estão expressos na figura 28. Esta última recolha foi realizada quando os frutos tinham, supostamente, vinte e quatro semanas. O fruto TMI é um fruto que já foi encontrado no mercado, pelo que serviu de controlo em todos os parâmetros. No que diz respeito ao diâmetro (Fig. 28A), todos os frutos apresentam diferenças significativas com o TMI, sendo que os tamarilhos vermelhos TVM 38 ( $3,16 \pm 0,15$  cm) e TJB 0 ( $3,28 \pm 0,25$  cm) são os mais pequenos. Relativamente ao comprimento (Fig. 28B), apesar de não apresentar diferenças significativas, os frutos TMC e TVM 28 são mais compridos que o TMI. Os frutos TVM 15, TVM 38 e TJB 0, são significativamente mais pequenos que os TMI. Quanto ao diâmetro do pedúnculo (Fig. 28C), ainda que de forma não significativa, os frutos laranja TJB 7 possuem um diâmetro do pedúnculo maior do que os TMI. Os frutos TMA, TMR, TVM 38, TJB 0, TJB 2, TJB 6, TJB 12 E TFF, apresentam o diâmetro de pedúnculo significativamente menor em relação ao controlo. Quanto ao peso (Fig. 28D), os frutos do controlo (TMI) são

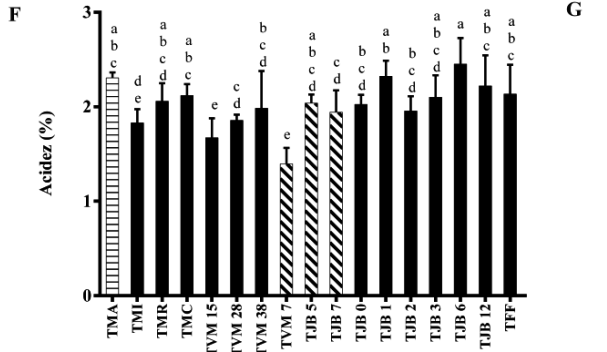
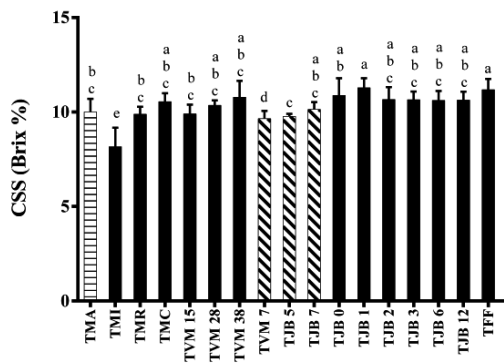
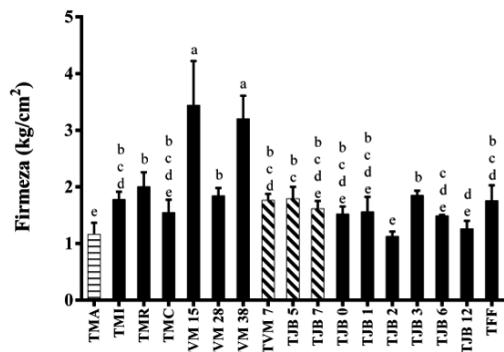
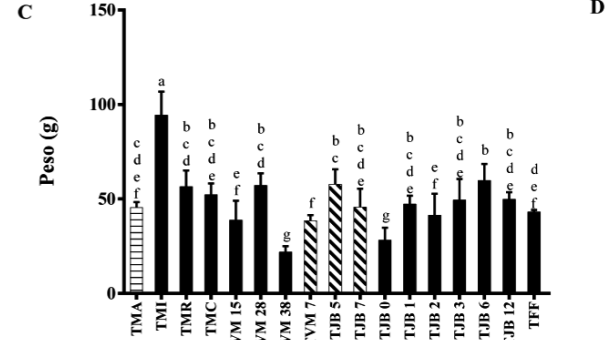
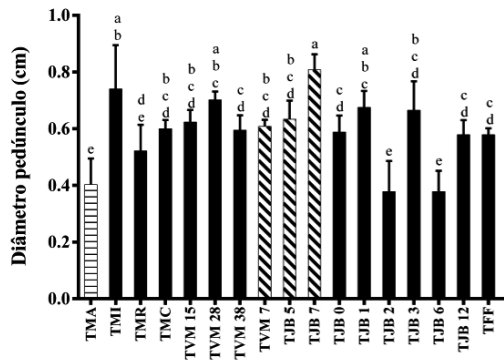
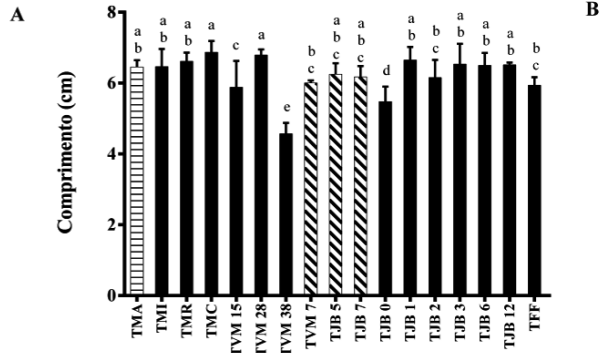
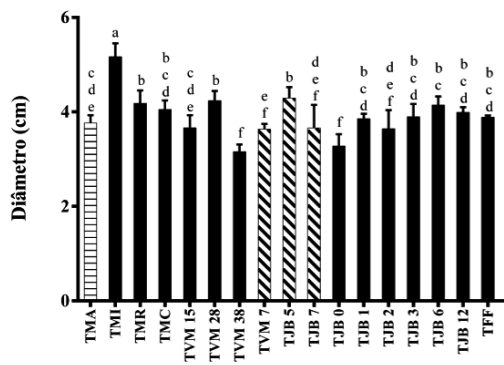
significativamente mais pesados que todos os outros, e os TVM 38 e TJB 0 são significativamente mais leves que os outros frutos, como acontece em relação ao tamanho (são mais pequenos). Na figura 28E, observa-se que os frutos TVM 15 e TVM 38 são significativamente mais duros que o controlo, e os frutos TMA e TJB 2 apresentam firmeza significativamente menor. Relativamente ao CSS (Fig. 28F), os tamarilhos do controlo (TMI) apresentam valor significativamente menor do que todos os outros frutos, sugerindo ser os menos doces. A acidez (Fig. 28G) é significativamente superior nos frutos TMA, TMC, TJB 1, TJB 6, TJB 12 e TFF.

De forma geral, os frutos laranjas são mais redondos (maior diâmetro) e pequenos (menor comprimento), com peso relativamente elevado, uma firmeza moderada, menos doces (menor CSS) e menos ácidos (menor percentagem de acidez) (em relação aos vermelhos). Por sua vez, os amarelos apresentam um diâmetro, comprimento e peso intermédios, firmeza baixa, elevados CSS e acidez. Os frutos vermelhos, por norma, são compridos (maior comprimento), mais achatados (menor diâmetro) e possuem um peso também elevado, firmeza moderada, são mais doces (maior CSS), mais ácidos (maior acidez) (do que os laranjas).

Dentro dos frutos vermelhos analisados, quando comparados com o TMI, os que apresentam melhores qualidades são os TVM 28 da Mealhada, TJB 12 do Jardim Botânico da UC e TFF da Figueira da Foz, uma vez que são os que apresentam maiores diâmetro, comprimento, diâmetro do pedúnculo, peso e CSS e menor firmeza e acidez. Pelo contrário, os de menor qualidade são TVM 38 da Mealhada e TJB 0, pois são os mais pequenos, leves e duros; apesar de um valor elevado de CSS, apresentam também um valor elevado de acidez.

No que respeita aos frutos laranjas, todos aparentam ser frutos de boa qualidade, embora o TJB 5 apresente maior diâmetro de entre os três, o TJB 7 maior diâmetro do pedúnculo, o TLM7 apresentar menor peso e acidez.

Os frutos amarelos não aparentam ter boa qualidade, uma vez que são pequenos no comprimento e diâmetro do fruto e do pedúnculo, e no peso. Apesar de um CSS razoavelmente elevado e firmeza relativamente baixa, apresenta uma acidez elevada.





**Figura 28** – Avaliação da qualidade dos frutos – recolha no estado maduro. Parâmetros biométricos: A) Diâmetro do Fruto. B) Comprimento do fruto. C) Diâmetro do pedúnculo. D) Peso do fruto. Análise sensorial: E) Firmeza do fruto. Parâmetros físico-químicos: F) Conteúdo de sólidos solúveis. G) Acidez. Os dados encontram-se ordenados por localidades: Madeira, Sargento-Mor, Mealhada, Jardim Botânico (Universidade de Coimbra) e Figueira da Foz, e agrupados pela variedade de tamarilho: amarelo vs laranja vs vermelho. Valores apresentados como média  $\pm$  DP ( $5 \leq n \leq 7$ ). Os valores indicados com letras diferentes, no mesmo gráfico, são significativamente diferentes pelo teste ANOVA de uma via ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.2. Análise química (ATR-FTIR e Raman)

Os espectros de ATR-FTIR e Raman do epicarpo externo (EpEx), epicarpo interno (EpIn), mesocarpo (Mes) e semente (S), obtidos dos tamarilhos TJB 1, TJB 5, TMI e TVM, estão representados nas figuras 29 e 31 e Tabelas 9 e 10, respetivamente. Os números de onda e atribuições correspondentes provisórias apresentam-se nas Tabelas 9 e 10, relativas ao ATR-FTIR e Raman, respetivamente. Esta distribuição de atribuições foi facilitada devido à existência de dados realizados neste campo, nomeadamente, em relação ao tomate (*Solanum lycopersicum*) (Ramirez *et al.*, 1992). Toda a análise dos resultados é feita de forma qualitativa, uma vez que não foram aplicados fatores corretivos relativamente às intensidades.

No que diz respeito à análise ATR-FTIR, os resultados experimentais (Fig. 29) mostram evidência da existência de variações entre as EpIn (em contacto com o mesocarpo) e a EpEx, uma vez que os espectros apresentam ligeiras diferenças entre estas duas partes do fruto, nomeadamente nos sinais: 1)  $720 \text{ cm}^{-1}$  associado a constituintes da cutina/ceras (España *et al.*, 2014), apenas presente no EpEx.; 2)  $1017 \text{ cm}^{-1}$  e 3)  $1317 \text{ cm}^{-1}$  ambos associados a polissacarídeos/pectinas (Nogales-Bueno *et al.*, 2017), (Lupoi *et al.*, 2015), (Szymanska-Chargot e Zdunek, 2013) e (Wilson *et al.*, 2000), apenas presente no EpIn; 4)  $1640 \text{ cm}^{-1}$  atribuído à água (Mojet *et al.*, 2010) e 5)  $1726 \text{ cm}^{-1}$  associado a ligações éster com compostos poliméricos abundantes na cutina externa (Heredia-Guerrero *et al.*, 2014), são inversos nos espectros, *i.e.*, o EpEx apresenta um pico menor no que diz respeito à água e um pico maior no que respeita aos compostos da cutina, em relação ao EpIn. Os sinais localizados em comprimentos de onda elevados ( $> 2500 \text{ cm}^{-1}$ ) são intensos no EpEx, e virtualmente indetetáveis no EpIn, particularmente nos:  $2849 \text{ cm}^{-1}$  e  $2917 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídos à  $\nu(\text{CH}_2)$  simétrica e assimétrica respetivamente, associados à lenhina, lípidos, cutina e ceras (Heredia-Guerrero *et al.*, 2014), (España *et al.*, 2014), (Ramirez *et al.*, 1992), (Nogales-Bueno *et al.*, 2017), (Lupoi *et al.*, 2015) e (Fasoli *et al.*, 2016) – neste caso, temos os dois picos fortes e definidos na EpEx, enquanto que no EpIn, são praticamente inexistentes. Ou seja, com base

nos sinais e respetivas atribuições e associações a componentes, verifica-se que o espectro do epicarpo externo possui mais bandas associadas a ceras, cutinas, lenhina e lípidos, devido à presença da cutícula, ao passo que, no epicarpo interno, embora existam bandas também associadas a ceras e cutinas, há um maior número de absorções associadas a polissacarídeos/pectinas e um sinal mais proeminente de água.

Foi ainda possível observar que os espectros do EpIn e Mes são semelhantes, diferindo apenas na presença, nos espectros do EpIn, dos sinais  $831\text{ cm}^{-1}$  associado a compostos fenólicos (Heredia-Guerrero *et al.*, 2014);  $1730\text{ cm}^{-1}$  associado a ésteres na cutina (Heredia-Guerrero *et al.*, 2014) e (Ramirez *et al.*, 1992);  $2923\text{ cm}^{-1}$  associada à lenhina, lípidos, cutina, ceras (Heredia-Guerrero *et al.*, 2014), (España *et al.*, 2014), (Ramirez *et al.*, 1992), (Nogales-Bueno *et al.*, 1992), (Lupoi *et al.*, 2015) e (Fasoli *et al.*, 2016); e  $2937\text{ cm}^{-1}$  associado a pectina (Govindaraj *et al.*, 2018). Neste caso, os espectros são diferentes, uma vez que, embora em contacto o mesocarpo e com várias associações a polissacarídeos, o epicarpo interno continua a apresentar compostos associados à cutina, lenhina e ceras, inerentes ao facto de ser o epicarpo e apresentar a cutícula. Destaca-se também o facto de o epicarpo do tamarilho ser rico em compostos fenólicos (Vasco *et al.*, 2009).

No que respeita à semente, destacam-se os sinais  $1093\text{ cm}^{-1}$  associado a ésteres (Heredia-Guerrero *et al.*, 2014) e (Ramirez *et al.*, 1992);  $1147\text{ cm}^{-1}$  associado a compostos fenólicos (Nogales-Bueno *et al.*, 1992);  $1547\text{ cm}^{-1}$  associado a compostos fenólicos aromáticos (Nogales-Bueno *et al.*, 1992) e (Ramirez *et al.*, 1992); e  $1742\text{ cm}^{-1}$  associado a ésteres/poliésteres/lenhinas (Nogales-Bueno *et al.*, 1992), (Szymanska-Chargot e Zdunek, 2013), (Wilson *et al.*, 2000) e (Fasoli *et al.*, 2016). Segundo Ramakrishnan *et al.* (2013), as sementes de tamarilho possuem 21,13 % de gordura; dentro desta, mais de 70,00 % é ácido linoleico, um ácido gordo que, por norma, se encontra na forma de éster, fazendo-se notar nos espectros de ATR-FTIR pelos sinais acima referidos.

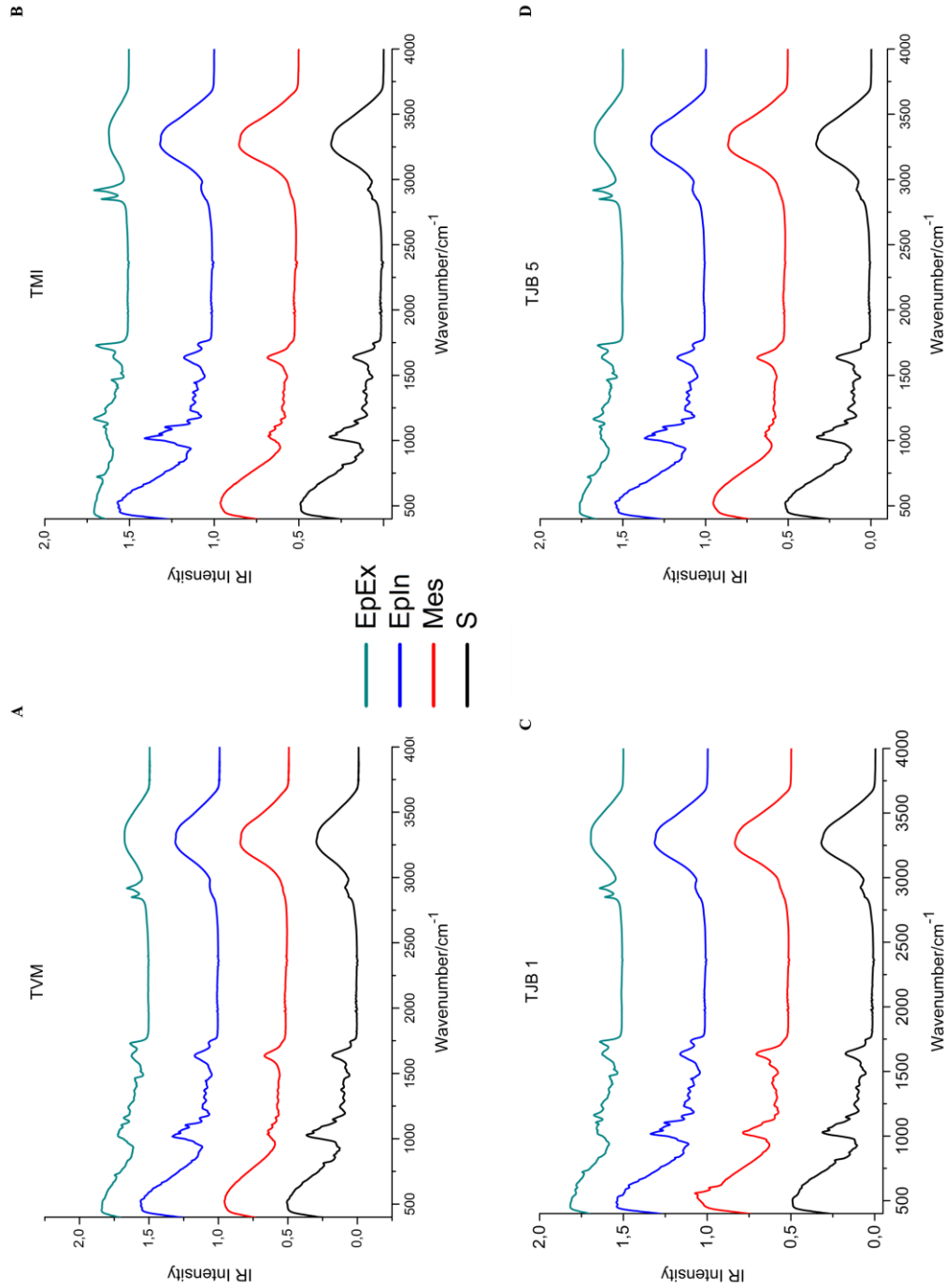
Uma vez que não foi realizada uma correção dos sinais, não é possível fazer uma avaliação quantitativa dos sinais obtidos, *i.e.*, não é possível atribuir um valor à intensidade de um sinal. No entanto, uma vez que o erro é de escala, é possível comparar qualitativamente os sinais, ou seja, num sinal que ocorre num determinado comprimento de onda, o sinal de um fruto possui uma intensidade maior que o outro. Uma vez que apenas está a ser realizada uma avaliação qualitativa, apenas podemos comparar os frutos dentro das mesmas regiões (Fig. 30), *i.e.*, comparar, por exemplo, o EpEx do TVM *versus* TMI *versus* TJB 1 *versus* TJB 5.

**Tabela 9** – Comprimentos de onda (cm<sup>-1</sup>) de espectroscopia FTIR-ATR e atribuições provisórias para os tamarilhos TVM, TMI, TJB 1 e TJB 5.

TVM	Epicarpo Externo			Epicarpo Interno			Mesocarpo			Semente			Atribuição	Outros trabalhos			
	TMI	TJB 1	TJB 5	TVM	TMI	TJB 1	TJB 5	TVM	TMI	TJB 1	TJB 5						
----	518sh	515	----	520	526	515	521	520	521	527	524	----	512	----	516	$\delta_{OP}(C-C)_{(fenóis)}$	518 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014
720	720	719	719	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	$\delta(CH_2)_{(cutina, ceras)}$	724 – Espanha <i>et al.</i> , 2014
----	----	831sh	----	831	831	831	831	831	831	831	831	831	831	831	831	$\delta_{OP}(C-H)_{(fenóis)}$	833 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014
----	969	970sh	----	971	968	970	967	969	967	960	960	963	962	963	963	$\nu(C-O)_{(cutina, polissac.)}$	967 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; Ramirez <i>et al.</i> , 1992
1018	1019	1019	1017	1017	1016	1016	1017	1017	1019	1027	1027	1027	1028	1029	1027	$\nu(C-O)\nu(C-C)_{ring}$ (Polissac., pectinas)	~1020 – Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017; Lupoi <i>et al.</i> , 2015; Szymanska-Chargot e Zdunek, 2013; Wilson <i>et al.</i> , 2000
1032	----	1031	----	----	----	----	1036	1036	1035	----	1036	----	----	----	----	$\nu(C-O)\nu(C-C)$ (Polissac., pectinas)	~1020 – Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017; Lupoi <i>et al.</i> , 2015; Szymanska-Chargot e Zdunek, 2013; Wilson <i>et al.</i> , 2000
1048	1054	1053	1052	1051	1050	1051	1051	1055	1053	1050sh	1055	1055	1055	1056	1053	$\nu(C-O-C)_{(glicosídica)}$	1050-60 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014
1065	1069	1069	----	----	----	----	1061	1061	1061	----	1060	----	----	----	----	$\nu(C-O-C)_{(glicosídica)}$	1050-60 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1093	1093	1091sh	1093	$\nu_{sym}(C-O-C)_{ester}$	1103 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; Ramirez <i>et al.</i> , 1992
1103	1104	1104	1105	1102	1103	1103	1102	1105	1104	1102	1105	----	----	----	----	$\nu_{sym}(C-O-C)_{ester}$	1103 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; Ramirez <i>et al.</i> , 1992
----	----	----	----	----	1148	----	----	----	----	----	----	1147	1147	1147	1147	$\nu(C-H)_{(fenóis)}$	1154 – Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017; Lupoi <i>et al.</i> , 2015

1160	1168	1161	1163	1157	----	1148	1156	1160	1158	1159	1159	1159	----	----	----	----	----	V <sub>asym</sub> (C-O-C) <sub>ester</sub>	1167 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; Ramirez <i>et al.</i> , 1992
1241	1242	1241	1243	1237	1236	1235	1239	1241	1243	1241	1241	1240	1244	1244	1244	1244	1242	v(C-O), δ(O-H) <sub>polissac, pectinas, lenhina</sub>	1235 – Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017; Lupoi <i>et al.</i> , 2015; Szymanska-Chargot e Zdunek, 2013; Wilson <i>et al.</i> , 2000
----	----	1262sh	----	1259	1260	1263	1260	1259	1259	----	----	1259	----	----	----	----	----	δ(O-H)	1278 – Ramirez <i>et al.</i> , 1992
----	----	----	----	1317	1316	1315	1317	1317	1316	1317	1319	1315	1315	1314	1315	1317	1317	δ(CH <sub>2</sub> ) <sub>Polissac, pectinas</sub>	1318 – Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017
1367	1357	1361	1359	1368	1368	1367	1368	1369	1368	1368	1369	1376	1376	1374	1376	1372	1372	δ <sub>op</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>Polissac, pectinas</sub> δ <sub>sym</sub> (CH <sub>3</sub> ), carotenoides	1370 – Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017; Lupoi <i>et al.</i> , 2015; Szymanska-Chargot e Zdunek, 2013; Wilson <i>et al.</i> , 2000; Shulz e Baranska, 2007
1455	1456sh	1443	----	1442	1442	1443	1442	1454	1443	1443	1444	1454	1442	1441sh	1442	1443	1443	v(C-C) <sub>aromáticos</sub> (fenóis)	1441 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017; Foo, 1981
1463	1464	1463	1462	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	δ(CH <sub>2</sub> ) <sub>cutina, ceras</sub>	1463 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; Espanha <i>et al.</i> , 2014; Ramirez <i>et al.</i> , 1992
1519	1517	1517	1516	----	----	----	----	----	----	1519	1517	1519	1517	1517	1517	1517	1517	v(C-C) <sub>aromáticos</sub> (fenóis)	1517 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017; Lupoi <i>et al.</i> , 2015
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1548	1557	1548	1547	1547	1547	1547	1547	v(C-C) <sub>aromáticos</sub> (fenóis)	1551 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; Ramirez <i>et al.</i> , 1992
1633	1641	1632	1633	1633	1635	1633	1634	1633	1634	1637	1632	1637	1637	1637	1637	1634	1634	Água	1635 – Mojet <i>et al.</i> , 2010
1729	1729	1729	1728	1733	1735	1733	1731	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	v(C=O) <sub>ester</sub> <sub>cutina</sub>	1730 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; Ramirez <i>et al.</i> , 1992

----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1739	1741	1740	1740	v(C=O ester) políesteres, pectinas, lenhina	1743 – Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017; Szymanska-Chargot e Zdunek, 2013; Wilson <i>et al.</i> , 2000; Fasoli <i>et al.</i> , 2016
2849	2849	2849	2849	----	----	----	----	----	----	----	----	----	2855	2854	2855	2853	2853	V <sub>sym</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>lenhina</sub> , lípidos, cutina, ceras.	2853 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; España <i>et al.</i> , 2014; Ramirez <i>et al.</i> , 1992; Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017; Lupoi <i>et al.</i> , 2015; Fasoli <i>et al.</i> , 2016	
2918	2917	2918	2917	2919	2919	2919	2919	2927	2917	2927	2919	2927	2923	2923	2924	2920	2920	V <sub>asym</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>lenhina</sub> , lípidos, cutina, ceras	2923 – Heredia-Guerrero <i>et al.</i> , 2014; España <i>et al.</i> , 2014; Ramirez <i>et al.</i> , 1992; Nogales-Bueno <i>et al.</i> , 2017; Lupoi <i>et al.</i> , 2015; Fasoli <i>et al.</i> , 2016	
----	----	----	----	2939	2941	2937	2940	2976-3706	2976-3706	2937	2941	2937	2940	2941	2937	2937	2941	2939	v(C-H) <sub>pectin</sub>	2937 - Govindaraj <i>et al.</i> , 2018
2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	2849	Água	3000-4000 – Mojzet <i>et al.</i> , 2010



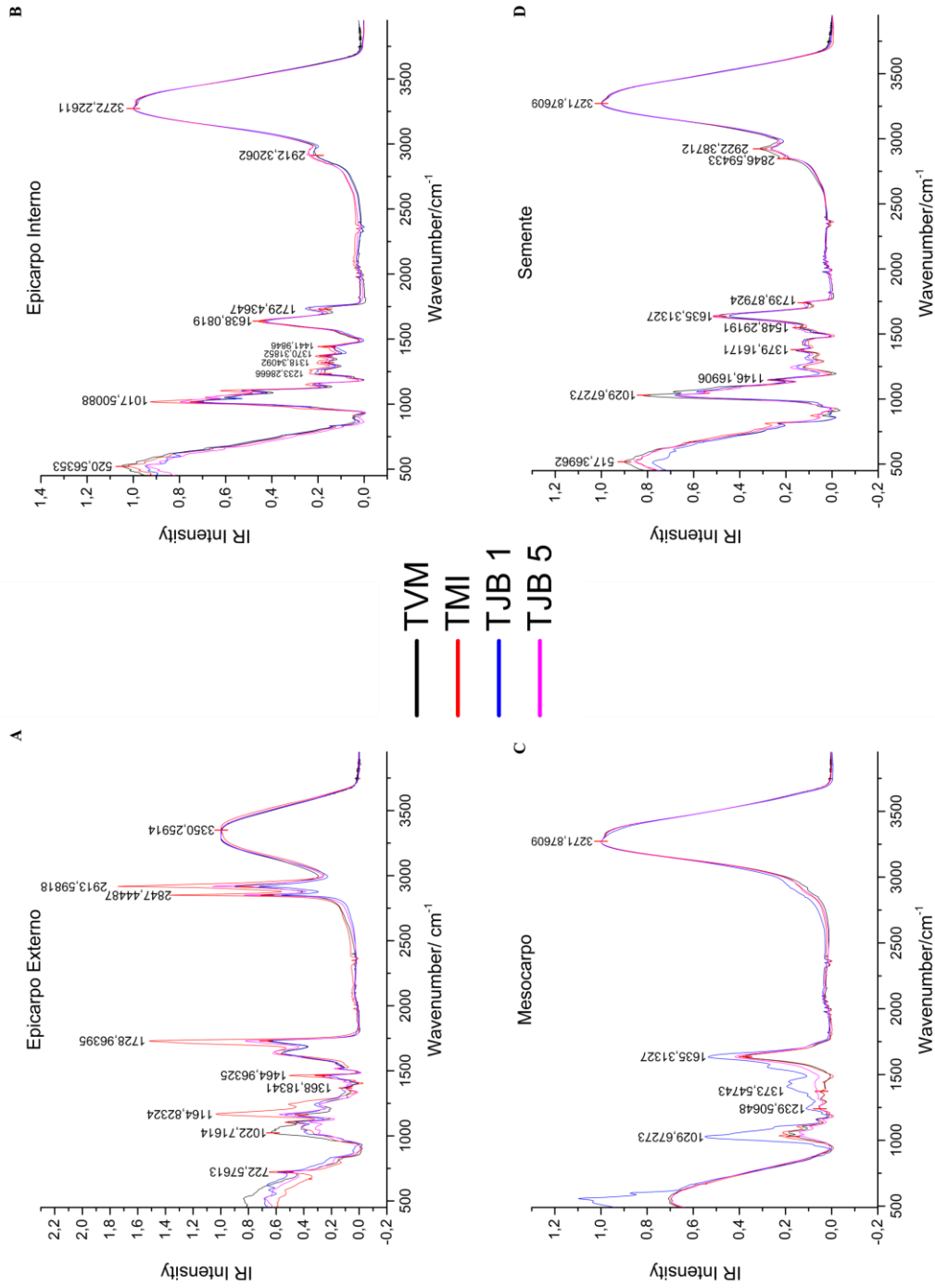
**Figura 29** – Espectros ATR-FTIR de cada fruto: A) TVM – Tamarillo Vermelho da Mealhada. B) TMI – Tamarillo Madeira Importado; C) e D) TJB – Tamarillo Jardim Botânico Universidade de Coimbra: 1 – Vermelho; 5 – Laranja. EpEx – Epicarpo Externo; EpIn – Epicarpo Interno; Mes – Mesocarpo; S – Semente. Para maior clareza, alguns espectros foram deslocados em relação aos outros.

Com base nos espectros figura 30, foram sublinhados na tabela 10 a: verde, o sinal de intensidade maior; vermelho, o sinal de intensidade menor. Na figura 30 e tabela 10, verifica-se que, no que diz respeito ao epicarpo externo, o TMI é o fruto que possui sinais de maior intensidade, e como tal, tem maior quantidade compostos das ceras, cutina, lenhina e lípidos. Pelo contrário, no mesocarpo, o TJB 1 apresenta maiores intensidades nos sinais que dizem respeito a polissacarídeos, pectinas, carotenos e água. As regiões do epicarpo interno e semente aparentam não variar consoante o fruto, uma vez que não existem grandes variações nos sinais.

A espectroscopia de Raman foi aplicada pela primeira vez neste fruto (Fig. 31 e Tabela 10). Nestes espectros, no caso do TVM e TJB 5 são apresentados dois espectros do mesocarpo. O Mes1 indica a presença de polifenóis (Da Silva *et al.*, 2008) e o Mes2 a de carotenoides (González *et al.*, 2014), embora estes dois perfis não tenham sido encontrados em todas as amostras. Isto acontece devido às diferentes profundidades de foco do microscópio e da heterogeneidade nativa das amostras.

Os carotenoides apresentam um efeito ressonante com o comprimento de onda de excitação, e a consequência direta deste efeito é o incremento da intensidade dos sinais associados aos carotenoides, e neste caso podemos dizer que está a ser realizada RSS – Resonance Raman Spectroscopy (González *et al.*, 2014). Nos frutos TMI e TJB 1 apenas se apresenta um espectro para o mesocarpo, devido ao elevado teor de água, que dificulta a focagem. No entanto, o espectro do mesocarpo do TMI apresenta sinais associados aos carotenoides, enquanto que no TJB 1 o espectro é dos polifenóis. No futuro, e com vista a facilitar a focagem, podem utilizar-se amostras congeladas com azoto líquido, uma vez que solidificaria a água e a interferência desta pode diminuir.

Ramakrishnan *et al.* (2013), verificou que as sementes de tamarilho possuem 21,13 % de gordura. Em relação a ácidos gordos, os mais abundantes são o ácido linoleico – C18:2 – (70,74 %), seguido do ácido oleico – C18:1 – (14,93 %), mas também estão presentes o ácido palmítico – C16:0 – (9,41 %), ácido esteárico – C18:0 – (2,23 %) e ácido linolénico – C18:3 – (1,73 %). Os espectros Raman das sementes dos quatro frutos em estudo apresentam uma similaridade elevada com o do ácido linoleico (Figura 32), exceto no sinal 1749  $\text{cm}^{-1}$  atribuído ao grupo éster carbonilo detetado nas sementes. Observa-se também a presença de sinais nos 1660  $\text{cm}^{-1}$  atribuído  $\nu(\text{C}=\text{C})$  a associado a cadeias de carbono insaturadas, e 3013  $\text{cm}^{-1}$  atribuído a  $\nu_{\text{sym}}(\text{=CH})$  associado às vibrações de tensão simétricas de ligações duplas de



**Figura 30** – Espectros ATR-FTIR e cada região do fruto: A) Epicarpo Externo. B) Epicarpo Interno. C) Mesocarpo. D) S – Semente. TVM – Tamarillo Vermelho da Mealhada. TMI – Tamarillo Madeira Importado. TJB – Tamarillo Jardim Botânico Universidade de Coimbra: 1 – Vermelho; 5 – Laranja. Para maior clareza, alguns espectros foram deslocados em relação aos outros.



cadeias insaturadas. Ambas as bandas  $\nu(\text{C}=\text{C})$  e  $\nu_{\text{sym}}(\text{=CHH})$ , são biomarcadores confiáveis do grau de insaturação deste tipo de compostos.

Tendo em conta a semelhança entre os perfis vibracionais das sementes das amostras e de ácidos gordos (Fig. 32), pode ser aplicado um tratamento de dados através da comparação de rácios espectrais das bandas mais representativas, tal como descrito por Jamieson *et al.* (2018) de forma a obter conhecimento mais preciso das características das amostras em análise. Deve atentar-se que estão a ser usados dados obtidos diretamente das sementes, que contêm outros compostos além dos ésteres de ácidos gordos (Ramakrishnan *et al.*, 2013). Mais ainda, os dados de Jamieson *et al.* (2018), foram obtidos de ácidos de gordos e não de ésteres, um facto que pode levar a diferenças na interpretação dos resultados. No trabalho de Jamieson *et al.* (2018), foi então possível estabelecer relações entre os diferentes sinais obtidos com o comprimento de onda de 532 nm, que permitem obter diferentes informações (Tabela 11).

A Tabela 12, permite inferir informações acerca do grau de insaturação e comprimento da cadeia dos ésteres de ácidos gordos. Os dados indicam um grau de insaturação superior a um, semelhante ao do ácido linoleico. Embora este resultado não seja consistente com os valores obtidos para o ácido linoleico, é possível concluir a predominância deste ácido gordo, provavelmente na forma de éster (de acordo com a frequência Raman  $\nu(\text{C}=\text{O})$  no pico 1749  $\text{cm}^{-1}$ ). O rácio entre  $I_{1660}$  e  $I_{1445}$ , atribuídos a  $\nu(\text{C}=\text{C})$  e  $\delta(\text{CH}_2)$ , respetivamente leva a um rácio de 0,07 entre o número de ligações duplas e grupos  $\text{CH}_2$ . No que respeita o quociente  $I_{3013}/I_{2856}$ , correspondendo a  $\nu_s(\text{=C-H})_{\text{cis}}$  e  $\nu_s(\text{CH}_2)$  respetivamente, a interpretação é díspar em relação à obtida para o ácido linoleico. Finalmente, o valor do rácio  $I_{2855}/I_{2932}$ , evidencia que as cadeias principais destes compostos contêm entre dez a onze  $\text{CH}_2$  por grupo  $\text{CH}_3$ . Em comparação com o valor teórico dos doze grupos  $\text{CH}_2$ , é possível estimar que a média de cadeias de carbono nos tamarilhos estudados seja menor. Contudo, é necessária contenção nas afirmações, devido à dificuldade da atribuição das bandas de Raman entre os 2850 e 2960  $\text{cm}^{-1}$ , uma vez que há contribuições de outros grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  neste intervalo, embora o modelo seja válido para este tipo de análise (Jamieson *et al.*, 2018).

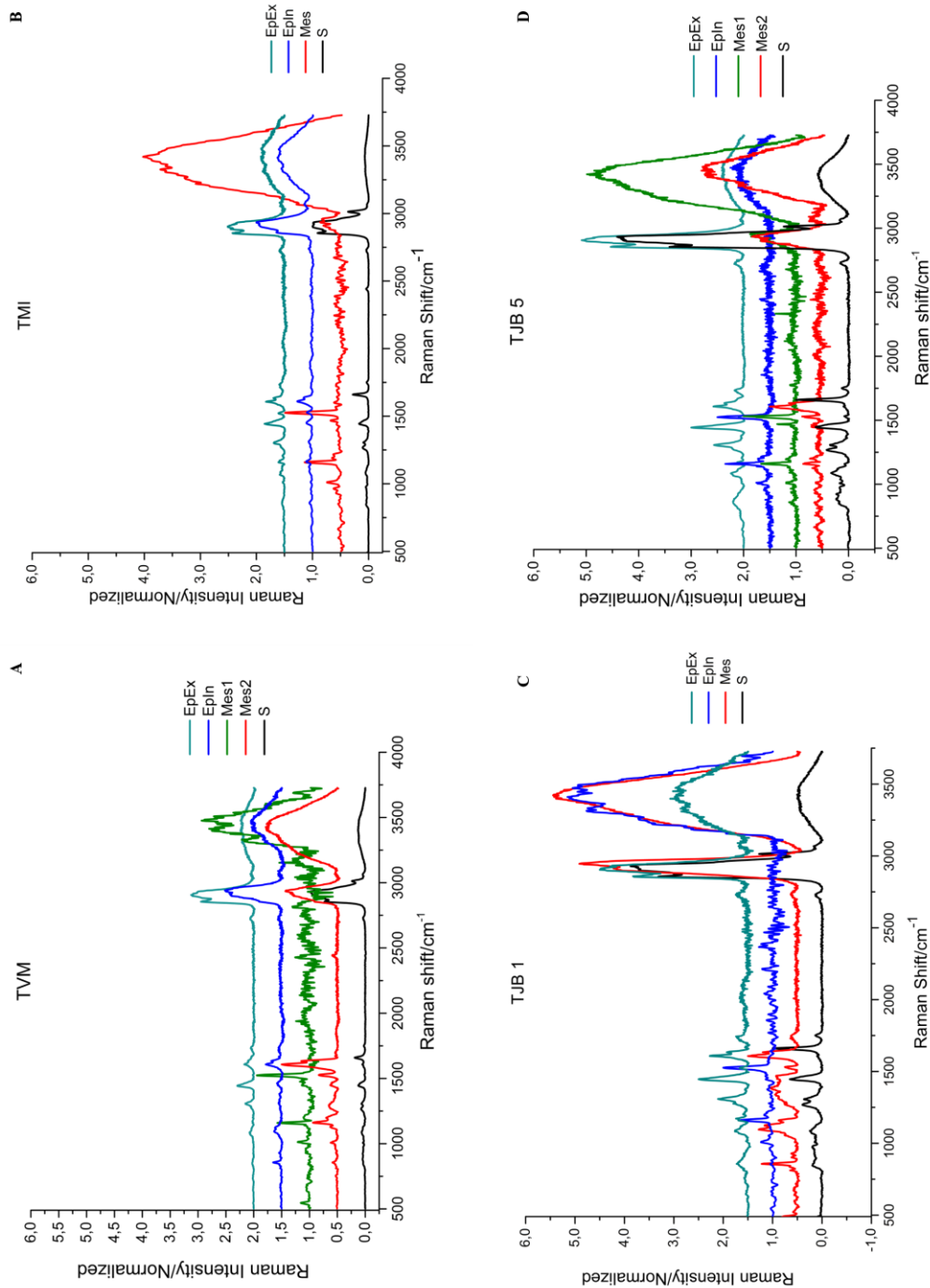
Os resultados obtidos a partir da análise dos espectros de Raman das sementes, parecem indicar um menor grau de insaturação em comparação com o padrão, no entanto, é de referir que estamos na presença de uma mistura de compostos, nomeadamente de ésteres de ácidos gordos, apesar da dominância do ácido linoleico (Ramakrishnan *et al.* (2013).

**Tabela 10** – Comprimentos de onda (cm<sup>-1</sup>) de espectroscopia de Raman e atribuições provisórias para os tamarilhos TVM, TMI, TJB 1 e TJB 5.

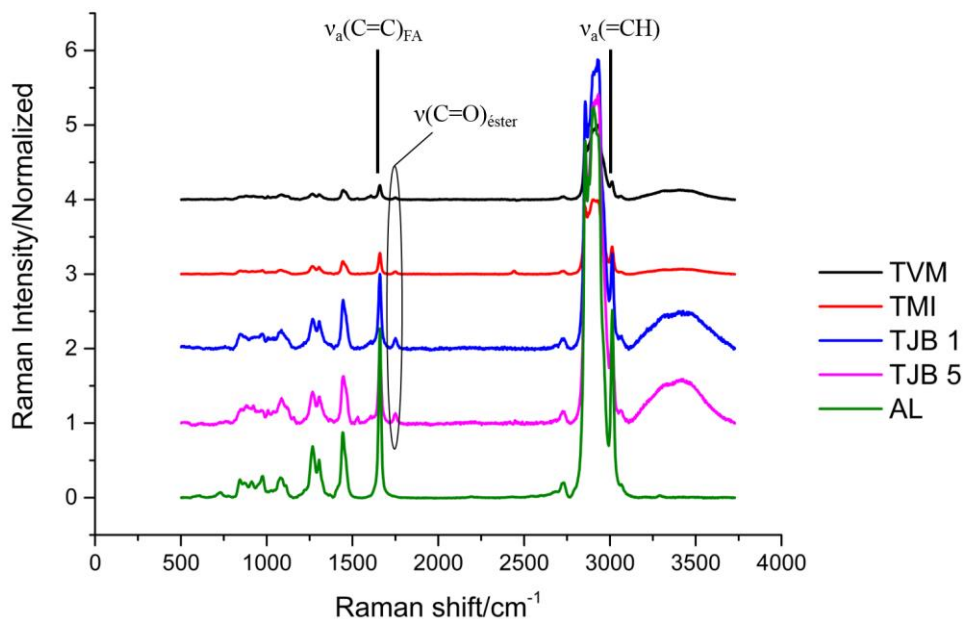
TVM	Epicarpo Externo				Epicarpo Interno				Mesocarpo				Semente				Atribuições	Outros trabalhos				
	TMI	TJB 1	TJB 5	TVM	TMI	TJB 1	TJB 5	TVM	TMI	TJB 1	TJB 5	TVM	TMI	TJB 1	TJB 5	TVM			TMI	TJB 1	TJB 5	
543	----	546	---	598	548	548	----	----	549	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	v <sub>ip</sub> (COC)	522 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008	
----	----	----	931	----	----	----	----	----	----	----	----	922	923	931	923	922	923	931	923	v <sub>ip</sub> (COC)	934 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Edwards <i>et al.</i> , 2005a; Edwards <i>et al.</i> , 2005b	
----	----	----	----	960	960	956	960	962	957	---	967	972	973	972	973	972	973	972	973	ω <sub>oop</sub> (C=C-H) <sub>carotenoides</sub> ρ(CH <sub>2</sub> ), ν(COH)	974 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Tschirmer <i>et al.</i> , 2009; González e Ureña, 2012	
1009	----	----	----	----	1009	1011	1012	1014	1014	1012	1009	1007	1007	1007	1007	1007	1007	1007	1007	1007	ρ <sub>ip</sub> (C-CH <sub>3</sub> ) <sub>carotenoides</sub> ν(C-C)	1007 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Tschirmer <i>et al.</i> , 2009; González e Ureña, 2012
1090	1087	1087	1084	1097	----	----	1097	----	----	1094	----	1087	1087	1087	1087	1087	1087	1087	1087	v <sub>asym</sub> (COC) glicosídica	1095 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Edwards <i>et al.</i> , 2005a; Edwards <i>et al.</i> , 2005b	
----	1110	1120sh	1110	1120	----	----	1130	----	----	1123	1126	1123	1126	1120	1126	1123	1126	1120	1120	v <sub>sym</sub> (COC) glicosídica	1125 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Edwards <i>et al.</i> , 2005a; Edwards <i>et al.</i> , 2005b	
1171	1172	1172	1172	----	1159	1159	1159	1159	1159	1159	1161	----	1156	----	1159	----	1156	----	1159	1159	v(C-C) <sub>carotenoides</sub>	1152 – González e Ureña, 2012; Shulz e Baranska, 2007
1271sh	----	1276sh	1271sh	----	----	----	----	----	----	1268	----	1265	1266	1268	1268	1265	1266	1268	1268	δ <sub>ip</sub> (=CH) <sub>eis</sub> lipídios	1265 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Bailey e Horvat, 1972; Melchiorre <i>et al.</i> , 2015	
1308	1306	1308	1306	----	----	----	----	----	----	1311	----	1308	1308	1306	1308	1308	1308	1306	1308	τ <sub>ip</sub> (CH <sub>2</sub> )	1302 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Melchiorre <i>et al.</i> ,	

1373	----	1373	1378	1381	----	----	----	----	----	1385	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	$\delta(\text{CH}_2)$ , $\delta_{\text{ip}}(\text{CH}_2)$	2015
1440	1445	1445	1443	----	----	----	----	----	----	----	1445	1445	1445	1448	1445	1445	1445	1445	1445	1445	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ lipídios e glicosídica	1381 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008 1441 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Edwards <i>et al.</i> , 2005a; Edwards <i>et al.</i> , 2005b; Shulz e Baranska, 2007; Larsson e Rand, 1973; Martini <i>et al.</i> , 2018
----	----	----	----	1463	1462	1462	1462	1462	1462	1462	1462	1463sh	1463sh	1467sh	----	1462	1462	1462	1462	1462	$\delta(\text{COH})$	1456 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Edwards <i>et al.</i> , 2005a; Edwards <i>et al.</i> , 2005b
1519	----	1522	----	----	----	----	----	----	----	1519	1522	1522	1519	----	1519	1519	1522	1522	1522	1522	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{arotenoides}}$	1520 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Tschimmer <i>et al.</i> , 2009; González e Ureña, 2012; Shulz e Baranska, 2007; González <i>et al.</i> , 2014
1526	----	----	1524	----	1529	1529	1529	1524	1529	1531	1529	1528	1531	1531	1531	1531	1528	1528	1531	1531	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{arotenoides}}$	1528 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Tschimmer <i>et al.</i> , 2009; González e Ureña, 2012; Shulz e Baranska, 2007; González <i>et al.</i> , 2014
1607	1607	1609	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	1607	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{polifenóis}}$	1604 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008
1631	1633	1633	1633	1633	1638	1633	1633	1633	1638	1633	1633	1633	1633	1633	1633	1633	1633	1633	1633	1633	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{fenóis}}$	1631 – Trebolazabala <i>et al.</i> , 2017
----	----	----	1667sh	----	----	----	----	----	----	----	1660	1660	1660	1660	1660	1660	1660	1660	1660	1660	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{ácido limoleico}}$	1658 – Martini <i>et al.</i> , 2018
1721	1731	----	1717	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{cera enticular}}$	1721 – Trebolazabala <i>et al.</i> , 2017

1734	----	1743	1734	----	----	1734	----	----	1736	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	v(C=O)cera cuticular	1721 – Trebolazabala <i>et al.</i> , 2017
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	v(C=O)éster de ácido gorduro	1746 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008
2732	2727	2732	2729	2740	2748	2727	2748	2736	2736	2744	2730	2730	2732	2732	2730	2730	2730	2730	2730	2732	[v(CH)antifáticos+δ(CH)]lipidos	2721 – Trebolazabala <i>et al.</i> , 2017
2855	2859	2859	2855	----	----	----	----	----	----	----	2855	2857	2855	2855	2855	2855	2855	2855	2855	2855	v <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> )cera cuticular, linoleico	2855 – Trebolazabala <i>et al.</i> , 2017; Machado <i>et al.</i> , 2012
2912	2916	2912	2906	2916	2916	2912	2916	2912	2912	2909	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	v(CH <sub>3</sub> )cera cuticular	2907 – Trebolazabala <i>et al.</i> , 2017
----	2928	2932	----	2942	2941	2943	2941	2945	2945	2941	2932	2932	2932	2932	2932	2932	2932	2932	2932	2932	[v <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> ), v <sub>as</sub> (CH <sub>3</sub> )]cera cuticular lipidos	2924 – Trebolazabala <i>et al.</i> , 2017
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	3013	3013	3013	3013	3013	3013	3013	3013	3013	3013	v <sub>sym</sub> (=C-H) <sub>cis</sub>	3013 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Machado <i>et al.</i> , 2012
3068	3074	3076	3068	3068	3071	3066	3071	----	----	3072	3066	3066	3066	3066	3066	3066	3066	3066	3068	3068	v <sub>sym</sub> (=C-H) <sub>Femil</sub> , metades dieno	3069 – Da Silva <i>et al.</i> , 2008; Shulz e Baranska, 2007
3100-3720																						Água



**Figura 31** – Espectros Raman de cada fruto: A) TVM – Tamarilho Vermelho da Mealhada. B) TMI – Tamarilho Madeira Importado; C) e D) TJB – Tamarilho Jardim Botânico Universidade de Coimbra: 1 – Vermelho; 5 – Laranja. EpEx – Epicarpo Externo; EpIn – Epicarpo Interno; Mes – Mesocarpo; Mes1 – carotenóides; Mes2 – polifenóis; S – Semente. \*B) Mes. – Mesocarpo: carotenóides. C) Mes. – Mesocarpo: polifenóis. Para maior clareza, alguns espectros foram deslocados em relação aos outros.



**Figura 32** – Espectros Raman das sementes dos frutos – TVM, TMI, TJB 1 e 5 – e Ácido Linoleico (AL).

**Tabela 11** – Parâmetros das retas de calibração de regressão linear com os valores de  $r^2$ , a 532 nm (Jamison et al., 2018).

Rácio	Declive	Ordenada na origem	$R^2$	Informação
$1262 \text{ cm}^{-1} / 1438 \text{ cm}^{-1}$	$0,613 \pm 0,02426$	$-0,134 \pm 0,06354$	0,9922	Número de ligações C=C – grau de insaturação
$1655 \text{ cm}^{-1} / 1438 \text{ cm}^{-1}$	$28,15 \pm 2,244$	$-0,4347 \pm 0,6263$	0,9692	Número de ligações C=C / número de grupos $\text{CH}_2$
$3005 \text{ cm}^{-1} / 2850 \text{ cm}^{-1}$	$1,249 \pm 0,0959$	$0,03831 \pm 0,05348$	0,9714	Número de H-C= / número de grupos $\text{CH}_2$
$2850 \text{ cm}^{-1} / 2933 \text{ cm}^{-1}$	$0,1738 \pm 0,01968$	$-1 \pm 0,2285$	0,9397	Número de grupos $\text{CH}_2$ / número de grupos $\text{CH}_3$ – comprimento da cadeia

**Tabela 12** – Rádios de intensidade semi-quantitativos dos espectros Raman das sementes do tamarilho (TVM, TMI, TJB 1, TJB5) comparadas com o ácido linoleico (AL).

	Rácio						Valor experimental					Valor exato
	TVM	TMI	TJB 1	TJB 5	AL		TVM	TMI	TJB 1	TJB 5	AL	AL
$I_{1268}/I_{1445}$	0,61	0,63	0,61	0,67	0,79	n(C=C)	1,21	1,24	1,21	1,31	1,5	2
$I_{1660}/I_{1445}$	1,52	1,67	1,53	1,59	2,59	n(C=C)/ n(CH <sub>2</sub> )	0,07	0,07	0,07	0,07	0,11	0,17
$I_{3013}/I_{2855}$	0,33	0,40	0,38	0,36	0,53	n(H-C=)/ n(CH <sub>2</sub> )	0,23	0,29	0,28	0,26	0,39	0,33
$I_{2855}/I_{2932}$	0,73	0,92	0,86	0,77	0,98	n(CH <sub>2</sub> )/ n(CH <sub>3</sub> )	9,96	11,05	10,67	10,21	11,4	12

É importante também mencionar que a reta de calibração utilizada pertence a outro grupo de estudo, e muito embora realizado no mesmo comprimento de onda, há a possibilidade de diferenças nos resultados, nomeadamente, devido a diferenças existentes entre os erros aleatórios que podem ser causados pelos grupos de trabalho (Jamienson *et al.*, 2018).

Resumindo, de um ponto de vista qualitativo, as maiores diferenças qualitativas encontradas são entre as diferentes partes do fruto (EpEx *versus* EpIn *versus* P *versus* S) mas não quando as mesmas partes são comparadas entre os diferentes variedades em estudo (ex: EpEx TVM *versus* EpEx TMI *versus* EpEx TJB 1 *versus* EpEx TJB 5). Contudo, de um ponto de vista semi-quantitativo, quer a intensidade Raman do EpIn TJB 5, quer a intensidade IR do EpEx TVM, são acentuadas:

- O sinal EpIn ATR-FITR perto dos 1000 cm<sup>-1</sup> associado polissacarídeos e pectinas é bastante maior do que no EpEx. O sinal perto dos 3000 cm<sup>-1</sup> associado a ceras, cutinas, lenhinas e lípidos está altamente presente no EpEx, e é desprezível nas outras partes do fruto.
- O espectro Raman das sementes é semelhante ao obtido para ácidos gordos. Aos 3013 cm<sup>-1</sup> há um sinal que está atribuído a ligações duplas de cadeias de carbono insaturadas do ácido gordo ou éster desse ácido gordo. Nos espectros Raman do mesocarpo são observadas assinaturas Raman dos carotenoides nos frutos TVM, TMI e TJB 1.





## 4. Conclusões e perspectivas futuras

### Propagação

Através dos resultados obtidos entre as linhas estabelecidas em 2014 e linhas estabelecidas em 2018, é possível concluir que: a idade de estabelecimento influencia negativamente a capacidade de propagação e/ou proliferação das plantas, não afetando, no entanto, a capacidade de enraizamento. Comparando os tipos de enraizamento, o *ex vitro*, embora menos competente na indução da raiz, mostra-se mais eficaz no desenvolvimento da raiz do que o *in vitro*. Através das taxas de sobrevivência, conclui-se que nem a variedade laranja vs vermelho, nem o tipo de enraizamento *in vitro* vs *ex vitro*, com choque auxínico ou não, têm influência na sobrevivência após a aclimatização. As condições variáveis de temperatura e humidade a que as plantas foram sujeitas influenciaram o seu desenvolvimento, pelo que, futuramente seria relevante conseguir manter condições controladas na estufa, e submeter todas as plantas dos diversos tratamentos às mesmas condições, durante o mesmo intervalo de tempo.

### Qualidade dos frutos

Aquando da primeira recolha, em Outubro, os frutos já possuíam, pelo menos, doze semanas de desenvolvimento. Dentro dos frutos analisados, quando comparados com o TMI, os que apresentam melhores qualidades para introdução no mercado são os TLM 7 e TVM 28 da Mealhada, TJB 5, TJB 7 e TJB 12 do Jardim Botânico da UC e TFF da Figueira da Foz.

Os resultados espectroscópicos vibracionais revelaram um elevado conteúdo de polifenóis antioxidantes. As assinaturas vibracionais distintas medidas para cada parte dos frutos (Epicarpo Externo, Epicarpo Interno, Mesocarpo, Semente) demonstraram diferenças químicas claras: as sementes são ricas em lípidos insaturados, particularmente ácidos gordos cis (principalmente na forma de éster), enquanto que o epicarpo apresenta um maior número de compostos fenólicos e ceras.

De futuro, seria interessante acompanhar o amadurecimento dos frutos mais cedo, *i.e.*, de forma a acompanhar todo o desenvolvimento do fruto, e incluir as técnicas espectroscopia de forma a acompanhar também que alterações químicas ocorrem nas diferentes partes do fruto.



## 5. Referências

- Acosta-Quezada, P.G., Riofrío-Cuenca, T., Rojas, J., Vilanova, S., Plazas and M., Prohens, J. (2016) Phenological growth stages of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.), an emerging fruit crop, according to the basic and extended BBCH scales. *Scientia Horticulturae*. 199: 216-223.
- Atkinson, R.G., Eagles, R.M., Forster, R.L.S. and Gardner, R.C. (1994) Genetic transformation of *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Springer-Verlag, Berlin, 29: 275-288.
- Antunes, P. (2010). Indução de plantas tetraplóides através de tratamento com agentes c-mitóticos no tamarilho (*Cyphomandra betacea*) e no medronheiro (*Arbutus unedo*). Tese de mestrado. Universidade de Coimbra.
- Bailey, G. F., and Horvat, R. J. (1972). Raman spectroscopic analysis of the *cis/trans* isomer composition of edible vegetable oils. *J. Am. Oil. Soc.* 49: 494-498.
- Bakshi P., Kour G. and Rafiq A. (2016) Tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt). In: *Underutilized Fruit Crops: Importance and Cultivation*, 1<sup>st</sup> edn, Chapter: Tamarillo, Jaya Publications, S.N.Ghosh, 1271-1294.
- Bhatia, S. and Sharma, K. (2015) Micropropagation. In: *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, 11: 361-368.
- Bilton, Jan. (2009) *Jan Bilton's Tamarillo Cookbook*.
- Bohs, L. (1989) Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). *Economic Botany*. 43:143-163.
- Bouman, Olaf T. and Sylliboy, Jennifer. (2012) Biomass allocation and photosynthetic capacity of willow (*Salix* spp.) bio-energy varieties. *Forstarchiv* 83: 139-143.
- Braga, A.I.M. (2015) Estabelecimento *in vitro* de genótipos de tamarilho e avaliação fisiológica das plantas obtidas. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Carvalho, J. and Vidal, M. (2003) *Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais*. Documentos 116 – Embrapa – ISSN – 0103-0205.

- Casa de encosturas (2017) Tamarillo Liqueur [online], [consultado 19 de Julho de 2019] Disponível em: <http://casadeencosturas.com/en/liqueurs/54-tamarillo-liqueur-500ml.html>.
- Chacón, S. (2014) Estudio de inteligência de mercados para la exportación de la fruta exótica “Tamarillo” hacia al país de Bélgica. Título de engenheiro de mercados. Facultad de Ingeniería – Universidad Piloto de Colombia, Colômbia.
- Chávez-Arias, C.C., Gómez-Caro, S. and Restrepo-Díaz, H. (2019) Physiological, biochemical and chlorophyll fluorescence parameters of *Physalis peruviana* L. seedlings exposed to different short-term águalogging periods and fusarium wilt infection. *Agronomy*. MDPI 9(5), 213.
- CRFG – California Rare Fruit Growers, (1996) Tamarillo [online], [consultado 19 de Julho de 2019] Disponível em: <https://www.crfg.org/pubs/ff/tamarillo.html>.
- Da Costa, C. M. M. (2016) Caracterização de alguns parâmetros de qualidade da polpa de fruta por FTIR-ATR. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior, Covilhã.
- Da Silva, C. E., Vandenabeele, P., Edwards, H. G. M., and Cappa de Oliveira. (2008). Nir-ft-raman spectroscopic analytical characterization of the fruits, seeds, and phytotherapeutic oils from roseships. *Anal. Bioanal. Chem.* 392: 1489-1496.
- Demtröder, W. (2008) *Laser Spectroscopy Vol. 2. Experimental Techniques*, Heidelberg, Germany: Springer. 2: 149-180.
- Edwards, H. G. M., Farwell, D. W., de Oliveira, L. F. C., Alia, J. M., Le Hyaric, M. and de Almeida, M. (2005a). FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. *Anal. Chim. Acta.* 532: 177-186.
- Edwards, H. G. M., Jorge Villar S. E., de Oliveira, L. F. C., and Le Hyaric, M. (2005b). Analytical Raman spectroscopic study of cacao seeds and their chemical extracts. *Anal. Chim. Acta.* 538: 175-180.
- España, L., Heredia-Guerrero, J., Segado, P., Benítez, J. J., Heredia, A., and Domínguez, E. (2014). Biomechanical properties of the tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cuticle during development are modulated by changes in the relative amounts of its components. *New Phytol.* 202: 790-802.

- Eurostat. (2019) Do you eat fruit and vegetables daily? [online], [consultado 19 de Julho de 2019] Disponível em: <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20190401-1?inheritRedirect=true>.
- Fasoli, M., Dell'Anna, R., Dal Santo, S., Balestrini, R., Sanson, A., Pezzotti, M., Monti, F., and Zenoni, S. (2016). Pectinas, hemicelluloses and celluloses show specific dynamics in the internal and external surfaces of grape berry skin during ripening. (2016). *Plant Cell Physiol.* 57(6): 1332-1349.
- Foo, L. Y. (1981). Proanthocyanidins: gross chemical structures by infrared spectra. *Phytochemistry.* 20: 1397-1402.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M. and Thorpe, T. A. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol – Plant.* 32: 272-289.
- González, A. G., and Ureña, A. (2012). Transmission resonance Raman spectroscopy: experimental results versus theoretical model calculations. *Appl. Spectrosc.* 66: 1163-1170.
- González, A. G., Martin, D., Slowing, K., and González Ureña, A. (2014). Insights into the  $\beta$ -Carotenóides Distribution in Carrot Roots. *Food Struct.* 2: 61-65.
- Govindaraj, D., Rajan, M., Akarfaj, A. A., and Murugan, A. (2018). From waste to high-value product: jackfruit peel derived pectin/apatite bionanocomposites for bone healing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 100: 293-301.
- Hai, H.D. (2018) *Solanum betaceum* [online], [consultado 13 de Abril de 2019]. Disponível em: <https://www.worldwidefruits.com/solanum-betaceum---tamarillo.html>.
- Heatherbell, D.A., Reid, M.S. and Wrolstad, R.E. (1982) The tamarillo: chemical composition during growth and maturation. *New Zealand Journal of Science.* 25: 239-243.
- Hegazi, Ghada A., Zayed, Mona S., Salem, Hanaa M. and Ibrahim, Walaa M. (2014). Effect of explant type and sequential subcultures on *in vitro* multiple shoots formation of Jojoba. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 4: 214-222.
- Heredia-Guerrero, J. A., Benítez, J., Domínguez, E., Bayer, I. S., Cingolani, R., Athanassiou, A., and Heredia, A. (2014).: a Review. *Front. Plant Sci.* 5: 305. DOI: 10.3389/fpls.2014.00305

- Hollas, M. J. (2007). Modern spectroscopy. John Wiley & Sons.137-196.
- IPMA – Instituto Português do Mar e Atmosfera. (2019) [online], consultado a 31 de Julho de 2019] Disponível em: <https://ipma.pt>.
- Jamieson, L.E., Li, A., Faulds, K. and Graham, D. (2018) Ratiometric analysis using Raman spectroscopy as a powerful predictor of structural properties of fatty acids. R. Soc. Open Sci. 5: 181-483.
- Larsson, K., and Rand, R. P. (1973). Detection of changes in the environment of hydrocarbon chains by raman spectroscopy and its application to lipid-protein systems. Biochimica et Biophysica Acta. Elsevier 326: 245-255.
- Lupoi, J. S., Singh, S., Parthasarathi, R., Simmons, B. A., and Henry, R. J. (2015). Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lenhina. Renew. Sust. Energ. Rev. 49: 871-906.
- Machado, N. F. L., Batista de Carvalho, L. A. E., Otero, J. C., and Marques, M. P. M. (2012). The autooxidation process in linoleic acid screened by raman spectroscopy. J. Raman spectrosc. 43: 1991-2000.
- Madeira, N. R., Teixeira, J. B., Arimura, C. T. and Junqueira, C. S. (2007) Influência da concentração de BAP e AG<sub>3</sub> no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. Horticultura Brasileira. 4: 982-985.
- Martín, D., Amado, A.M., González, A.G., Marques, P.M., Marques, de Carvalho, L.A. E. B. and González Ureña, Á. (2019) FTIR Spectroscopy and dft calculations to probe the kinetics of  $\beta$ -carotenóides thermal degradation. The Journal of Physical Chemistry. 25: 5266-5273.
- Martini, W. S., Porto, B. L. S., de Oliveira, M. A. L., and Sant'Ana, A. C. (2018). Comparative study of the lipid profiles of oils from kernels of peanut, babassu, coconut, castor and grape by GC-FID and Raman Spectroscopy. J. Braz. Chem. Soc. 29(2): 390-397.
- McClelland, M. T., Smith, M. A. L. and Carothers, Z.B. (1990). The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. Plant cell tissue and organ culture. 23: 115-123.

- Melchiorre, M., Ferreri, C., Tinti, A., Chatgililogly, C. and Torreggiani, A. (2015). A promising raman spectroscopy technique for the investigation of trans and cis cholesteryl ester isomers in biological samples. *Appl. Spectrosc.* 69: 613-622.
- Mojet, B. L., Ebbesen, S. D. and Lefferts, L. (2010). Light at the interface: the potential of attenuated total reflection infrared spectroscopy for understanding heterogeneous catalysis in water. *Chem. Soc. Rev.* 39: 4643-4655.
- Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Hernández-Hierro, J. M., Byrne, H. J., and Heredia, F. J. (2017). Study of phenols extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and Raman Spectroscopy. *Food Chem.* 232: 602-609.
- Norton, M. F. and Norton, C.R. (1986) Change in shoot proliferation with repeated *in vitro* subculture of shoots of woody species of Rosaceae. *Plant cell tissue and organ culture.* 5: 187-197.
- Núcleo Ambiental SAS. (2015) Manual Tomate de árbol. Cámara de Comercio de Bogotá. Gill Sans.
- PortugalFoods. (2012) Portugal Excepcional: Estratégia de Internacionalização do Setor Agroalimentar 2012-2017.
- Prohens J., Nuez F. (2001) The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): a review of a promising small fruit crop. *Small Fruits Review* 1: 43-68.
- Raj, A., (2018) – Study notes on Organogenesis | Biotechnology. Biology discussion [online], [consultado em 17 de julho de 2019] Disponível em: <http://www.biologydiscussion.com/plants/plant-tissue-culture/study-notes-on-organogenesis-biotechnology/61330>.
- Ramakrishnan Y., Khoddami, A., Gannasin, S.P. and Muhammad, K. (2013) Tamarillo (*Cyphomandra betaceae*) seed oils as a potential source of essential fatty acid for food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Acta Horticulturae*, 1012: 1415-1421.
- Raman, C.V. and Krishnan, K.S. (1928) A New Type of Secondary Radiation. *Nature.* 121: 501-202.
- Ramírez, F. J., Luque, P., Heredia, A., and Bukovac, M. J. (1992). Fourier Transform IR of enzymatically isolated tomato fruit cuticular membrane. *Biopolymers.* 32: 1425-129.

- Rong-hua L., Pei-guo G., Baum M., Grando S. and Ceccarelli, S. (2006) Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agric. Sci. China* 5: 751-757.
- Ruelas-Chacon, X., Contreras-Esquivel, J.C., Montañez, J., Aguilera-Carbo, A.F., Reye-Vega, M.L., Peralta-Rodriguez, R.D. and Sánchez-Brambila, G. (2017) Guar Gum as an edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of roma tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Food Quality*, vol. 2017, Article ID 8608304, 9 pages, DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/8>.
- Sánchez-Veja, I. (1992) Frutales Andinos. Em: *Cultivos marginados, otra perspectiva de* 1492, FAO, España.26: 179-189.
- Schotsmans, W.C. (2011) Tamarillo (*Solanum betaceum* (Cav.)). Em: *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*. Woodhead publishing, Cambridge. 4 (21): 427-442.
- Shulz, H., and Baranska, M. (2007). identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 43: 13-25.
- Silva, M.A., Jifon, J.L., da Silva, J.A.G. and Sharma, V. (2007) Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Braz. J. Plant Physiol.* 19: 193-201.
- Singh, A. and Agarwal, P.K. (2016). Enhanced micropropagation protocol of *ex vitro* rooting of a commercially important crop plant *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider. *Journal of Forest Science*, 62:107-115.
- Smith and Caughey's (2019) Tamarillo Chutney [online], [consultado 19 de Julho de 2019] Disponível em: <https://www.smithandcaugheys.co.nz/shop/food-and-wine/fine-foods/preserves-sauces-spreads-30075/tamarillo-chutney>.
- Smith, E., and Dent, G., (2005). *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. John Wiley & Sons, Ltd. 72: 71-112.
- Sunandakumari, C., Martin, K.P., Chithra, M., Sini, S. and Madhusoodanan, P.V. (2004) Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of herbal spice, *Mentha piperita* L. *Indian Journal of Biotechnology*. 3: 108-112.



- Szymanska-Chargot, M., and Zdunek, A. (2013). Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food Biophys.* 8: 29-42.
- Trebolazabala, J., Maguregui, M., Morillas, H., de Diego, A., and Madariaga, J. M. (2017). Portable Raman Spectroscopy for an in-situ monitoring the ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 180: 138–143.
- Tridge. (2019) real-time wholesale market prices of tamarillo [online], [consultado 13 de Abril de 2019]. Disponível em: <https://www.tridge.com/intelligences/tamarillo?fbclid=IwAR3be-3GvouECjWPXJSIhiOyJ9-445XZnxXfbknV2ZYPw-QXxYDxJ7HcnTY>.
- Tschirner, N., Schenderlein, M., Brose, K., Schlodder, E., Mroginski, M. A., Thomsen, C., and Hildebrandt, P. (2009). Resonance Raman spectra of  $\beta$ -carotenóides in solution and in photosystems revisited: an experimental and theoretical study. *Phys. Chem.* 11: 11471-11478.
- Vasco, Catalina, Avila, Jenny, Ruales, Jenny, Svanberg, Ulf and Kamal-eldin, Afaf. (2009). Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60: 278-288.
- Vujovic, T., Ruzic, Dj. and Cerovic, R. (2012) *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. *Scientia Horticulturae*. 39: 101-107.
- Wilson, R. H., Smith, A. C., Kačuráková, M., Saunders, P. K., Wellner, N. and Waldron, K. W. (2000). The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polissacarides studied by fourier-transform infrared spectroscopy. *Plant Physiol.* 12: 397-406.
- Workman, J. (2001). *Handbook of organic compounds*. Academic Press. 209-242.
- Zimmerman, R.H. (1981) Micropropagation of fruit plants. *Acta Horticulturae*. 120: 217-222.