

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL
CAMPUS BENTO GONÇALVES

**DATA DE COLETA E ARMAZENAMENTO DE ESTACAS
SOBRE A QUALIDADE FITOTÉCNICA E PERFIL
HORMONAL DE MUDAS DE VIDEIRA**

MIKAEL MÁRCIO BENATI

Bento Gonçalves, agosto de 2022

MIKAEL MÁRCIO BENATI

**DATA DE COLETA E ARMAZENAMENTO DE ESTACAS
SOBRE A QUALIDADE FITOTÉCNICA E PERFIL
HORMONAL DE MUDAS DE Videira**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto ao curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus Bento Gonçalves, como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Viticultura e Enologia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Cury da Silva

Coorientador: Dr. Henrique Pessoa dos Santos

Bento Gonçalves, agosto de 2022

MIKAEL MÁRCIO BENATI

**DATA DE COLETA E ARMAZENAMENTO DE ESTACAS
SOBRE A QUALIDADE FITOTÉCNICA E PERFIL
HORMONAL DE MUDAS DE Videira**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto ao curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus Bento Gonçalves, como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Viticultura e Enologia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Cury da Silva

Coorientador: Dr. Henrique Pessoa dos Santos

Aprovado em ___ / ___ / ___

Prof. Dr. Leonardo Cury da Silva – Orientador – IFRS Campus Bento Gonçalves

Prof. Me. Luis Carlos Diel Rupp – IFRS Campus Bento Gonçalves

Prof. Dr. Eduardo Giovannini – IFRS Campus Bento Gonçalves

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas bênçãos e capacidades concedidas e por seu infinito amor.

Agradeço à minha família pelo apoio em todos os momentos, pela educação e valores transmitidos.

Agradeço a meus amigos, desde aqueles dos tempos da Orquestra e Coral Juvenil de Erechim até aqueles feitos ao longo do curso por todo o apoio e amizade.

Agradeço aos professores do IFRS campus Bento Gonçalves pelo trabalho e dedicação e, sobretudo, pelo conhecimento transmitido.

Agradeço ao professor Leonardo Cury da Silva pelo empenho, orientação e amizade.

Agradeço de forma especial ao meu orientador na Embrapa Uva e Vinho, Henrique Pessoa dos Santos pela oportunidade de trabalho, amizade, confiança, orientação e por todos os ensinamentos.

Agradeço com o mesmo carinho aos meus colegas da Embrapa, Aline Mabel Rosa, Daniel Antunes Souza e Daniel Grohs pela amizade, auxílio e orientação.

Agradeço aos meus colegas da Vinícola Aurora pelo apoio e amizade.

Agradeço a todas as pessoas que entraram em minha vida ao longo deste percurso.

Agradeço.

“As circunstâncias do nascimento de alguém são irrelevantes. É o que você faz com o dom da vida que determina quem você é.”

Mewtwo

Pokémon: O Filme

RESUMO

No Brasil, a produção de uvas para processamento está concentrada na Região Sul. Nestes estados, as possibilidades de ampliação das áreas de cultivo são muito restritas. Portanto, os produtores são forçados à prática do replantio para renovação dos vinhedos ou para a troca de cultivares. Além de não haver uma regulamentação oficial para viveiristas produtores de mudas de videira, um dos fatores que contribui para a restrição da vida útil dos parreirais é a produção de mudas na propriedade. Esta prática não possui nenhum cuidado sanitário ou critério técnico que assegure a qualidade da muda produzida. Por não haver um modelo oficial de certificação, tem sido trabalhado em algumas soluções alternativas para a constituição e o fornecimento de plantas-matrizes sadias. Contudo, além de plantas matrizes com genética e qualidade garantida, é preciso avançar nos ajustes das etapas de produção das mudas, sobretudo na enxertia, para que se obtenham melhores índices quantitativos e qualitativos. Assim, partiu-se da premissa que as condições iniciais de cada estaca empregada na enxertia atuem como fatores importantes na fisiologia, qualidade e sobrevivência da muda. O experimento foi realizado na Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, em 2019. Foram empregadas as variedades ‘Bordô’ e ‘Paulsen 1103’, sendo realizados três tratamentos: T1 - estacas coletadas em 20/jun e armazenadas por dois meses em câmara fria; T2 – estacas coletadas em 22/jul e armazenadas por um mês em câmara fria; e T3 - estacas coletadas em 27/ago, sem armazenamento em câmara fria. Após as coletas, as estacas foram esterilizadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio, embaladas com plásticos, seladas e armazenadas ou não em câmara fria. A técnica de enxertia foi a de mesa, realizada em 28/ago, sendo as mudas parafinadas com cera comercial, dispostas em caixas plásticas com vermiculita e levadas até câmara de forçagem por 35 dias. Após, foram levadas até estufa para aclimação por 10 dias sendo então submetidas à uma avaliação fitotécnica, registrando o número de mudas com calo, o percentual de crescimento de calo, número de mudas brotadas e o desenvolvimento fenológico dos brotos. Após, foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido as porções do porta-enxerto, corte de enxertia e enxerto. As amostras foram moídas e submetidas à extração hormonal com solução de acetonitrila, metanol e ácido fórmico. Os extratos foram concentrados, ressuspensos com ácido fórmico e purificados em colunas SPE MCX com água e ácido fórmico; metanol; e hidróxido de amônio. Os eluídos foram concentrados, ressuspensos com metanol e água e submetidos à detecção e quantificação hormonal em cromatógrafo UPLC acoplado a detector MS para 9 grupos hormonais. De forma geral, T3 apresentou os melhores resultados fitotécnicos. Na análise hormonal, os níveis de ABA e GA₃ foram variáveis e pouco relacionados com as épocas de coleta e tempos de câmara fria. Os maiores níveis de AJ foram encontrados em T1, enquanto que AS, Z, tZ-R e AIA foram encontrados em maior concentração em T2 e T3. EPI e GA4 não foram detectados.

Palavras-chave: *Vitis*. Produção de mudas. Enxertia. Hormônios. Espectrometria de massa.

ABSTRACT

In Brazil, the production of grapes for processing is concentrated in the Southern Region. In these states, the possibilities of expanding the cultivation areas are very restricted. Therefore, producers are forced to practice replanting to renew vineyards or to change cultivars. In addition to the fact that there is no official regulation for nurseries that produce grapevine grafted plants, one of the factors that contributes to the restriction of the useful life of the vineyards is the production of grafted plants on the property. This practice does not have any sanitary precaution or technical criteria to assure the quality of the grafted plant produced. As there is no official certification model, some alternative solutions have been worked on for the constitution and supply of healthy mother plants. However, in addition to mother plants with guaranteed genetics and quality, it is necessary to advance in the adjustments of the grafted plants production stages, especially in grafting, in order to obtain better quantitative and qualitative indices. Thus, it was assumed that the initial conditions of each cutting used in grafting act as important factors in the physiology, quality and survival of the grafted plants. The experiment was carried out at Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS, in 2019. Were used the varieties 'Bordô' and 'Paulsen 1103', with three treatments: T1 - cuttings collected on Jun/20 and stored for two months in cold chamber; T2 – cuttings collected on Jul/22 and stored for one month in cold chamber; and T3 - cuttings collected on Aug/27, without storage in cold chamber. After the collections, the cuttings were sterilized by immersion in sodium hypochlorite solution, packed with plastic, sealed and stored or not in cold chamber. The grafting technique was bench grafting, performed on Aug/28, with the grafted plants paraffined with commercial wax, placed in plastic boxes with vermiculite and taken to a forcing chamber for 35 days. Afterwards, they were taken to a greenhouse for acclimatization for 10 days and then submitted to a phytotechnical evaluation, recording the number of grafted plants with callus, the percentage of callus growth, number of sprouted grafted plants and the phenological development of the sprouts. Afterwards, were collected and frozen in liquid nitrogen portions of the rootstock, graft cut and graft. The samples were grinded and submitted to hormonal extraction with a solution of acetonitrile, methanol and formic acid. The extracts were concentrated, resuspended with formic acid and purified on SPE MCX columns with water and formic acid; methanol; and ammonium hydroxide. The eluates were concentrated, resuspended with methanol and water and subjected to hormonal detection and quantification in a UPLC chromatograph coupled to an MS detector for 9 hormone groups. In general, T3 presented the best phytotechnical results. In the hormonal analysis, the levels of ABA and GA3 were variable and little related to the collection times and cold chamber times. The highest levels of JA were found in T1, while SA, Z, tZ-R and IAA were found in higher concentration in T2 and T3. EPI and GA4 were not detected.

Key words: *Vitis*. Grafted plants production. Grafting. Hormones. Mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porções da muda que foram utilizadas para amostragem de tecidos para a análise hormonal.....	34
Figura 2: Sequência de etapas que foram empregadas na produção das mudas.....	35
Figura 3: Fase inicial do protocolo de extração e detecção hormonal.....	36
Figura 4: Sequência do protocolo de extração e detecção hormonal	38
Figura 5: Acúmulo e disponibilidade de HF ($T \leq 7,2^{\circ}\text{C}$) entre os períodos dos dias 10, 20 e 30 dos meses de junho (T1), julho (T2) e agosto (T3) de 2019, em Bento Gonçalves/RS	42
Figura 6: Resultados das avaliações fitotécnicas: mudas com calo (%), soldadura média das mudas com calo (%) e mudas brotadas (%) nos tratamentos	44
Figura 7: Gráficos de barras das concentrações (ng.g^{-1} massa fresca) de ABA e GA_3 determinadas nas regiões do porta-enxerto (P), corte de enxertia (C) e enxerto (E) das mudas nos diferentes tratamentos	47
Figura 8: Gráficos de barras das concentrações (ng.g^{-1} massa fresca) de AJ e AS determinadas nas regiões do porta-enxerto (P), corte de enxertia (C) e enxerto (E) das mudas nos diferentes tratamentos	48
Figura 9: Gráficos de barras das concentrações (ng.g^{-1} massa fresca) de Z e tZ-R determinadas nas regiões do porta-enxerto (P), corte de enxertia (C) e enxerto (E) das mudas nos diferentes tratamentos	51
Figura 10: Gráfico de barras das concentrações (ng.g^{-1} massa fresca) de AIA determinadas nas regiões do porta-enxerto (P), corte de enxertia (C) e enxerto (E) das mudas nos diferentes tratamentos	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos envolvendo a combinação de datas de coleta de estacas a campo (2019) e os tempos de armazenamento em câmara fria	32
Tabela 2: Escala utilizada para avaliação fenológica dos brotos.....	34
Tabela 3: Avaliação do desenvolvimento fenológico dos brotos	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 ORIGEM E BOTÂNICA DA VIDEIRA.....	14
2.2 ENXERTIA.....	16
2.3 FITORMÔNIOS.....	18
2.3.1 Auxinas.....	19
2.3.2 Citocininas.....	20
2.3.3 Giberelinas.....	21
2.3.4 Ácido abscísico.....	22
2.3.5 Etileno.....	23
2.3.6 Brassinosteroides.....	24
2.3.7 Jasmonatos.....	24
2.3.8 Ácido salicílico.....	25
2.4 ANÁLISE FITORMONAL.....	25
2.5 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA FORMAÇÃO DA MUDA.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 GERAL.....	31
3.2 ESPECÍFICOS.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETATIVO, PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO FITOTÉCNICA DAS MUDAS.....	32
4.2 PREPARO E EXTRAÇÃO HORMONAL DOS TECIDOS.....	35
4.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS HORMONAIS.....	37
4.4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO HORMONAL.....	39
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5. DISCUSSÃO E RESULTADOS.....	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	55

1. INTRODUÇÃO

Ano a ano observa-se um aumento no consumo de vinhos pelos brasileiros. Um bom exemplo disto foi observado no ano de 2020, onde o consumo per capita foi de 2,7L, um aumento de 30% em comparação com o ano de 2019, onde, em média, cada cidadão adulto consumiu 2L da bebida. Estes valores culminaram em aproximadamente 460 milhões de litros em 2020, frente aos 360 milhões de litros consumidos em 2019 (MARTINS, 2021; REVISTA GLOBO RURAL, 2021).

Da mesma forma que o consumo, a produção de uvas no Brasil seguiu a tendência de aumento, sendo que na safra 2019/20 foi colhido aproximadamente 1,43 milhão de toneladas frente ao 1,68 milhão de toneladas da safra 2020/21 (IBGE, 2021a; IBGE, 2021b). No país, a produção de uvas destina-se principalmente ao processamento, ou seja, à elaboração de sucos, vinhos e espumantes, porém, a produção de uvas de mesa também apresenta destaque, tanto para comercialização no mercado nacional quanto internacional (EMBRAPA, 2021).

A produção de uvas para processamento está concentrada principalmente na Região Sul do Brasil, sobretudo no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, que respondem por 94% da produção nacional. Nestes estados, a tradição do cultivo da uva está intimamente associada à colonização italiana, em pequenas propriedades de administração familiar. As possibilidades de ampliação destas áreas de cultivo são muito restritas em função do relevo, do custo da terra e da necessidade de desmatamento, que é proibido pela atual legislação ambiental (Lei 11.428/2006). Portanto, os produtores são forçados à prática do replantio para renovação dos vinhedos ou para a troca de cultivares e, na maioria das vezes, enfrentam problemas de declínio e morte de plantas antes dos 10 anos após o plantio, descapitalizando e agravando sua situação econômica (LAZZAROTTO, TAFFAREL & MONTEIRO, 2016).

Esse cenário é contrastante com a crescente demanda por uvas e seus derivados, exigindo uma maior atenção da pesquisa e da assistência técnica para garantir a sustentabilidade do setor. Um dos fatores que contribui diretamente para essa restrição na vida útil dos parreirais é a produção de mudas na propriedade. Esta prática não possui nenhum cuidado sanitário ou critério técnico que assegure a qualidade da muda produzida e também aumenta o risco de replicar os problemas já existentes na propriedade. Morte precoce de plantas, redução de produtividade e a contaminação de áreas sadias com pragas e doenças são algumas das

consequências do emprego destas mudas e que, a longo prazo, podem comprometer a permanência das famílias no meio produtivo (EMBRAPA, 2013).

Um aspecto que também estimula a produção de mudas na propriedade rural é o custo das mudas oriundas de viveiros, que muitas vezes não possuem um acompanhamento técnico rígido que certifique sua qualidade, sendo produzidas apenas com base no conhecimento empírico do viveirista. Além disso, não são raras as vezes em que estas mudas são de qualidade inferior. Com isto, além de o produtor rural ter de arcar com um custo elevado na obtenção das plantas, muitas vezes também corre o risco de prejudicar sua área produtiva pelo uso de mudas de baixo desempenho.

Em muitos países, existem entidades oficiais responsáveis pela obtenção, desinfecção e disponibilização de material vegetativo básico para viveiristas. Estas, possuem protocolos padronizados de produção e certificação de mudas, garantindo sua qualidade e segurança fitossanitária (MARTELLI, 1999; GROHS et al, 2017). Essa, contudo, não é a realidade brasileira, dado que a certificação da produção de mudas de videira no país ainda aguarda por uma regulamentação oficial e com normas de conformidade técnica. Assim, no cenário atual o viveirista precisa atender apenas os critérios mínimos para a comercialização das mudas, não havendo um controle oficial de sua qualidade fitossanitária (ALMEIDA, 2002; BRASIL, 2004).

Por não haver um modelo oficial de certificação, tem sido trabalhado em algumas soluções alternativas para a constituição e o fornecimento de plantas-matrizes sadias. Instituições de pesquisa como a Embrapa, têm gerado material vegetativo sadio que, confirmando a sua capacidade técnica e o atendimento dos requisitos mínimos de propagação, é sistematicamente transferido aos viveiristas (GROHS et al, 2015).

Projetos de pesquisa como o “Mudas de qualidade superior” liderado pela Embrapa Uva e Vinho em parceria com universidades e vinícolas, têm mostrado à comunidade produtiva a importância do uso de material vegetativo de qualidade na produção de mudas para a implantação e renovação de vinhedos (ZANELLA, 2017). Contudo, além de plantas matrizes com genética e qualidade sanitária garantida, é preciso também avançar nos ajustes das etapas da produção das mudas, sobretudo na enxertia, para que se obtenham melhores índices quantitativos e qualitativos dessas. Em média, com a enxertia de mesa os viveiristas obtêm um rendimento muito variável, com uma amplitude de 50 a 80% (KUHN, REGLA & MAZZAROLO, 2007), com grande frequência próximo dos 50%. Ou seja, em média, são necessários 200 enxertos para se garantir 100 mudas de qualidade no final do processo.

Conforme GRAMAJE & DI MARCO (2015), as principais etapas de produção comercial de mudas compreendem: 1º) coleta e armazenagem do material propagativo; 2º) enxertia e parafinagem; 3º) forçagem; 4º) aclimatação; e 5º) transporte e plantio. Considerando-se em detalhes cada uma dessas etapas para tentar elevar o rendimento de mudas, percebe-se que a primeira etapa (coleta e armazenamento) pode ser altamente influenciada pelas condições locais de cultivo das plantas matrizes.

A época de coleta das estacas para enxertia tem sido realizada ao longo do período hibernal, mas não tem sido definida ou considerada como um fator de variação na qualidade fisiológica das estacas para enxertia. Dependendo da época em que o material foi retirado do campo, o estado de dormência pode ser variável e as exigências de tempo de armazenamento podem ser distintas. Segundo REGINA (2002), o armazenamento dos ramos, envoltos em filme plástico e mantidos em câmara fria até o momento da enxertia, tem sido empregado como uma estratégia para o alongamento do período de produção das mudas, possibilitando o ajuste do escalonamento da mão de obra e logística do viveirista. Contudo, o acúmulo de frio no campo (época de coleta) e o tempo de exposição ao frio na câmara fria (tempo de armazenamento) podem ter grande influência nos processos bioquímicos e fisiológicos da cicatrização da enxertia e qualidade de muda.

Os genótipos de videira apresentam diferentes necessidades de frio para indução e superação do estado de dormência, sendo que um tempo maior de exposição ao frio favorece a precocidade e a uniformidade da brotação das gemas (ANZANELLO, FIALHO & SANTOS, 2018; ANZANELLO & CHRISTO, 2020). Portanto, em invernos amenos, quentes ou irregulares, com dias quentes intercalados com os períodos de frio, a câmara fria poderia suprir a demanda de cada genótipo para superar a dormência.

Considerando-se que os processos de rizogênese e de calogênese da enxertia dependem do status fisiológico das estacas, coordenados principalmente pelo perfil hormonal dos tecidos (MELNYK, 2016; TEDESCO et al., 2022), neste trabalho partiu-se da premissa que as condições iniciais de cada estaca, ou seja, o momento da coleta e o tempo de armazenamento em câmara fria atuam como fatores importantes na fisiologia, qualidade e sobrevivência da futura muda.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORIGEM E BOTÂNICA DA VIDEIRA

O termo “videira” é empregado popularmente para designar as plantas produtoras de uvas, sejam elas para produção de vinhos, sucos e doces ou para consumo *in natura* e passificação. Entretanto, este termo é muito mais abrangente, podendo fazer referência a todos os genótipos integrantes do gênero *Vitis*, o qual, possui grande destaque nos âmbitos histórico, sociocultural e agroeconômico a nível mundial.

O gênero *Vitis* compreende cerca de 60 diferentes espécies de plantas (THIS et al, 2006). Estas, apresentam características semelhantes, como repouso vegetativo em clima temperado, tronco lenhoso, ramos flexíveis, folhas alternadas ao longo do ramo geralmente apresentando lóbulos e/ou dentição, gavinhas opostas às folhas, flores hermafroditas - salvo algumas exceções - reunidas em uma panícula, frutos carnosos do tipo baga e presença de uma a quatro sementes em cada baga.

Supõe-se que o surgimento da videira, ou ainda, de seu ancestral, ocorreu no território da atual Groenlândia e data de cerca de 65 milhões de anos atrás, no início do período Terciário. Em seu estado selvagem, estas plantas eram trepadeiras bastante vigorosas presentes nas florestas decíduas. Seus troncos e ramos eram bastante flexíveis e sustentavam-se nas árvores próximas, podendo atingir alturas de 20 a 30 metros (MULLINS et al, 1992), possuíam flores dioicas, cachos pequenos e de poucas bagas.

Ao longo do período Quaternário, iniciado há cerca de 2,6 milhões de anos, ocorreram diversas glaciações, ou eras do gelo, as quais, forçaram o “deslocamento” das plantas a regiões de climas menos extremos. Este “deslocamento” levou as videiras, ou seus ancestrais, aos atuais territórios Americanos e Europeus, e em seguida, aos territórios Africanos e Asiáticos (ALVARENGA et al, 1998; SOUSA, 1996; SOUZA, 2013).

Ao se deslocarem, as videiras encontraram novos ambientes que proporcionavam bom desenvolvimento e refúgio das condições climáticas extremas, e assim, acabaram concentrando-se nestes territórios, adaptando-se a eles. Estes locais são chamados de Centros de Origem e Dispersão. Para a videira, são hoje aceitos três Centros: o Americano, compreendendo os territórios desde o sul dos Estados Unidos, México, até a Costa Rica; o Euroasiático, composto pelas regiões próximas ao Mar Mediterrâneo e da Península Balcânica;

e o Asiático, com as regiões a sudeste do Mar Negro, Cáucaso, China e porção sudoeste do continente Asiático (PASSAIA, 2009; SOUSA, 1996).

A adequação das plantas às características edafoclimáticas dos novos territórios garantiu grande variabilidade morfogenética, com diversas modificações estruturais e seleção dos espécimes mais adaptados a cada local, sendo que os representantes com melhor desenvolvimento perpetuavam suas características, seja por completarem seus ciclos reprodutivos naturalmente, resultando na dispersão de sementes, ou pela ação humana, através da propagação de porções vegetativas.

Graças a essas adaptações, cada Centro possui variedades nativas com características específicas diferentes das dos outros Centros. No Centro Americano surgiram espécies como *Vitis labrusca*, *cinerea*, *berlandieri*, *bourquina*, *riparia*, *rupestris*, dentre outras. Já no Centro Asiático, originaram-se espécies como *V. flexuosa*, *amurensis*, *lanata*, *armata*, *romaneti*, *reticulata* e outras. E no Centro Euroasiático, a única espécie que se tem registro foi a *V. vinifera* (MULLINS et al, 1992).

A intervenção humana no desenvolvimento dessas plantas levou à sua domesticação, onde eram selecionadas as plantas com características mais chamativas, fossem elas de caráter produtivo ou de desenvolvimento vegetativo, e mais adaptadas ao ambiente em que se encontravam. Esta domesticação está intimamente ligada à produção de vinho pelos povos antigos. Entretanto, não existe um consenso quanto ao momento exato de sua domesticação, havendo uma variação na literatura compreendendo desde 8300a.C até 3500a.C (ESTÊVÃO, 2016; GIOVANNINI, 1999; HARARI, 2020; LEÃO, 2013; TERRAL et al, 2010).

Hoje, após sua domesticação e com manejo adequado, a videira apresenta vigor mediano, elevada florescência e frutificação, excelente capacidade regenerativa, tolerância a estresses bióticos e abióticos e longevidade (MULLINS et al, 1992).

Comparando as atuais espécies de videira e seus ancestrais, as características que apresentam maiores modificações e foram de maior importância são as de sua fase reprodutiva. Inflorescências hermafroditas, produção regular, cachos maiores, com maior número de bagas e maiores teores de açúcares e pigmentos determinaram o sucesso do cultivo da videira e, conseqüentemente, da produção de vinho.

Entretanto, não se sabe se todas essas modificações ocorreram de forma contínua e cumulativa, e nem o modo que tais modificações ocorreram. Se através de um longo período

de tempo, por meio de adaptação ao ambiente e cruzamentos sexuais espontâneos ou guiados pela seleção natural ou humana; ou se ocorreram rapidamente, por meio de mutações, seleção e subsequente propagação e dispersão (THIS et al, 2006).

Até meados do século XIX, a grande maioria dos vinhedos existentes, se não sua totalidade, era cultivada em pé-franco, isto é, a partir de estacas das próprias variedades produtivas plantadas diretamente no solo. Por volta de 1860, videiras de espécies nativas americanas foram levadas para o continente europeu visando o estudo do controle do míldio (*Plasmopora viticola*) e do oídio (*Uncinula necator*). Porém, logo após a introdução destas espécies, foram observados sérios danos às plantas *V. vinifera* já existentes nos vinhedos franceses. Estes danos foram então associados à filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), um pequeno inseto sugador descrito pela primeira vez em 1854, encontrado em videiras do leste dos EUA (GARRIDO & SÔNEGO, 2007; SORIA & DAL CONTE, 2005) que teria sido trazido juntamente com as plantas americanas. O inseto, que provocava danos tanto à parte aérea quanto radicular das plantas, propagou-se rapidamente por todas as regiões vitícolas europeias, ocasionando perdas significativas na produção de uvas, morte de plantas e encarecimento da produção de vinhos (MARTINS, 1991).

Concomitantemente, observou-se que, ainda que atacadas pelo inseto, as espécies americanas apresentavam resistência à ação da filoxera. Este fato levou os produtores a adotarem a prática da enxertia, utilizando as espécies americanas como porta-enxertos para as variedades viníferas. Esta é uma prática ainda presente na viticultura atual, sendo indispensável à produção de variedades viníferas.

2.2 ENXERTIA

A enxertia é uma técnica de propagação assexuada de vegetais, ou seja, não envolve a união de gametas para geração de um embrião. Nessa, são utilizadas estacas de diferentes plantas, denominadas “plantas-matrizes”. Uma planta propagada por enxertia é composta por duas partes: enxerto e porta-enxerto. O enxerto é a porção que desenvolverá a parte aérea e produzirá frutos. O porta-enxerto dá suporte à planta, sendo encarregado de formar o sistema radicular, e, portanto, extrair água e nutrientes do solo para nutrir o enxerto (GIOVANINNI, 1999).

Por vezes, há também uma terceira parte, o inter-enxerto ou filtro, colocado entre o enxerto e o porta-enxerto, utilizado para evitar problemas de incompatibilidade entre estes (NACHTIGAL, FACHINELLO & HOFFMANN, 2005) ou para “filtrar” características do porta-enxerto, como vigor excessivo. O uso de inter-enxertia é pouco comum na viticultura, sendo mais utilizada na produção de *Prunus*, *Malus* e *Citrus*.

A enxertia na viticultura é empregada sempre que a área de cultivo apresenta características que dificultem o bom desenvolvimento da planta. Estas, podem se dar pela presença de agentes bióticos causadores de estresse, como insetos como a filoxera e a pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis*), nematoides ou fungos de solo causadores de doenças radiculares; ou ainda por condições abióticas, como características climáticas e condições químicas e físicas inadequadas de solo, tais como elevada salinidade, teores de minerais, umidade, composição e compactação (GIOVANINNI, 1999).

Na viticultura, umas das técnicas de enxertia mais utilizadas por viveiristas é a enxertia de mesa. Esta, consiste na união do enxerto e do porta-enxerto através de um corte em formato de ômega (Ω) realizado por máquina. Dentre as principais vantagens desta prática, destacam-se a padronização e o rendimento da operação, podendo ser produzidas de 3 a 5 mil mudas por dia, independentemente das condições climáticas; e, sobretudo, a facilidade para produzir mudas dentro dos padrões oficiais exigidos, tais como soldadura e enraizamento (KUHN, REGLA & MAZZAROLO, 2007; NACHTIGAL, FACHINELLO & HOFFMANN, 2005).

A produção de mudas por enxertia de mesa leva tempo e envolve diversas etapas, podendo variar conforme a prática, estrutura e mão-de-obra do viveirista. Geralmente ocorre da seguinte maneira: após a queda das folhas e lignificação dos ramos, são coletadas estacas das plantas-matrizes, que são então mantidas em câmaras frias para suprir a demanda de frio para a superação da dormência das gemas. Após, as estacas são enxertadas e parafinadas, sendo então levadas à uma câmara de forçagem, onde a nova planta irá se desenvolver, formando sua parte aérea e sistema radicular em condições de elevada umidade e temperatura. Uma vez formada, a nova muda é então podada e plantada no solo, a fim de adaptar-se às condições ambientais, para então, após um ciclo vegetativo, ser arrancada e comercializada. Este processo, desde o momento da coleta do material vegetativo até o arranquio da muda, leva em torno de dois anos (KUHN, REGLA & MAZZAROLO, 2007).

A enxertia pode ser feita em diferentes épocas, contudo, é majoritariamente realizada durante o inverno, pois assim o desenvolvimento da união entre enxerto e porta-enxerto e o

enraizamento da estaca acontecerão paralelamente à retomada do metabolismo de crescimento na primavera (COOKSON et al, 2013).

Todo esse processo tem influência direta na fisiologia da planta, e suas respostas aos cortes, armazenamento em frio, enxertia, forçagem e aclimação e a indução do enraizamento e calogênese são finamente reguladas pelos fitormônios.

2.3 FITORMÔNIOS

Os hormônios vegetais, ou fitormônios, são biomoléculas de diferentes naturezas químicas que atuam como sinalizadores, ou mensageiros químicos, produzidos em uma célula e que modulam os processos celulares de outra, proporcionando uma espécie de “comunicação” entre as partes da planta. Esta comunicação se dá através de uma sofisticada rede de percepção de sinal, decodificação, modificação e transformação nas células receptoras, que resultam em eventos transcricionais ou pós-transcricionais e induzem uma resposta fisiológica ou de desenvolvimento (BHATLA, 2018; KELLER, 2020; TAIZ et al. 2017). Essas moléculas são responsáveis por regular e coordenar o metabolismo, crescimento, desenvolvimento e morfogênese da planta. Sua síntese ocorre pela percepção das condições exógenas, seja de fatores abióticos como mudanças de temperatura e luminosidade, condições de solo, excesso ou déficit hídrico e danos mecânicos; ou bióticos, como ataque de insetos e outros animais ou microorganismos como fungos, bactérias e vírus.

Por definição, os hormônios vegetais são moléculas sintetizadas na planta que influenciam em sua fisiologia, enquanto que moléculas sintéticas ou naturais produzidas por outros seres, como fungos e bactérias, e que também apresentem influência no desenvolvimento vegetal são denominadas reguladores de crescimento (MELO, 2002).

A literatura clássica define que o desenvolvimento vegetal é regulado por cinco classes principais de hormônios, sejam eles moléculas únicas ou de estrutura e ação semelhante, denominados: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno. Entretanto, nas últimas décadas foram identificadas uma grande variedade de moléculas que apresentam ação e influências em diversos processos fisiológicos que antes eram creditados unicamente às cinco classes hormonais (PEREIRA-NETTO, 2019). Essas moléculas, atuam juntamente com os hormônios principais, em maior ou menor grau, na regulação do desenvolvimento vegetal, seja

diretamente nos processos celulares e na percepção ambiental ou como marcadores e desencadeadores de expressão gênica.

Com estas descobertas, as classes hormonais foram ampliadas em número e passaram a ser nove, com a adição dos brassinosteroides, dos jasmonatos, do ácido salicílico e das estrigolactonas. Além destes, mais e mais moléculas continuam a ser identificadas quanto à sua ação na fisiologia das plantas, como poliaminas, óxido nítrico e indolaminas (como serotonina e melatonina), além de uma série de peptídeos e de outros compostos como as karriquinas (BHATLA, 2018). Assim, acredita-se que a lista de hormônios vegetais e moléculas sinalizadoras continuará se expandindo nos próximos anos, sobretudo devido a uma melhor compreensão do crescimento e desenvolvimento vegetal e aos avanços tecnológicos dos métodos analíticos (MÜLLER & MUNNÉ-BOSCH, 2011; TAIZ et al. 2017).

Uma classificação generalista divide os hormônios vegetais em dois grupos: os promotores de desenvolvimento e os inibidores ou de estresse, cada um deles com atividades restritas e independentes dos demais. Entretanto, mesmo possuindo formas únicas e específicas de síntese e ação, os hormônios vegetais atuam em conjunto e em diferentes proporções ao longo do ciclo vegetativo, com respostas fisiológicas distintas em cada fase, adaptando o crescimento e o desenvolvimento das plantas às condições ambientais.

2.3.1 Auxinas

O termo “auxina” provém do grego *auxein*, que significa “crescer, aumentar” e foi proposto em 1926 por Fritz Went, que demonstrou a presença de uma substância ativa na promoção do crescimento do coleóptilo de gramíneas (MERCIER, 2019). Porém, seus efeitos já tinham sido relatados em 1832, por De Candolle, que fez as primeiras observações sobre o fototropismo. De Candolle observou que as plantas mantidas dentro de casa cresciam se voltando para as janelas em busca de luz e não em busca de ar, como era postulado na época (BHATLA, 2018).

Anos mais tarde, em 1881, Charles Darwin e seu filho Francis relataram em seu livro *The power of movement in plants* que quando expostos à uma luz unidirecional, coleóptilos de alpiste (*Phalaris canariensis*) mudavam a direção de seu crescimento normal e curvavam-se em busca da luz. Além disso, quando eram decapitados ou uma tampa opaca era colocada em

seu topo, a resposta à luz unidirecional era anulada. Isto os levou a concluir que havia uma espécie de percepção no topo do coleótilo em relação à luz (BHATLA, 2018).

Trabalhos como o de Went e subsequentes levaram à identificação de uma molécula sinalizadora sintetizada em ápices caulinares responsável pela percepção da luz e pelo crescimento. Em 1946, esta molécula foi isolada de grãos imaturos de milho (*Zea mays*) e denominada de ácido indolacético (AIA), sendo sequencialmente encontrada em todas as espécies vegetais, em concentração mais abundante e de forma fisiologicamente mais ativa (TAIZ et al. 2017). Além desta, outras moléculas foram identificadas por sua ação semelhante ao AIA, como o ácido indol-3-butírico (AIB) e o ácido fenilacético.

Por possuir uma estrutura relativamente simples, pesquisadores rapidamente conseguiram sintetizar moléculas com atividade semelhante ao AIA, como é o caso do ácido naftaleno acético (ANA), o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico (dicamba). Estas, são hoje amplamente utilizadas na agricultura, seja como reguladores de crescimento ou herbicidas (TAIZ et al. 2017).

De forma geral, a síntese de auxinas está associada aos tecidos que apresentam rápida divisão celular e em desenvolvimento, sobretudo em meristemas apicais caulinares, folhas jovens, frutos em crescimento e sementes. Estão envolvidas em processos como divisão, expansão e alongamento celular, no desenvolvimento de botões florais, na diferenciação vascular, na formação de raízes adventícias e na promoção da dominância apical. A ação herbicida das auxinas sintéticas se deve às altas concentrações empregadas, sendo que em concentrações mais baixas, sua atividade é semelhante à do AIA (BHATLA, 2018; MERCIER, 2019).

2.3.2 Citocininas

As citocininas são moléculas indutoras de citocinese, ou seja, de divisão celular. Atuam também na morfogênese vegetal, na quebra da dominância apical e desenvolvimento de órgãos laterais, na mobilização de nutrientes, na atividade enzimática, na formação de cloroplastos e no atraso da senescência foliar (PERES & KERBAUY, 2019; KALRA & BHATLA, 2018). E de forma indireta, desempenham papel importante no estabelecimento de relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos (TAIZ et al. 2017).

Na década de 50, o fisiologista vegetal Folke Skoog e sua equipe buscavam identificar a substância ou os fatores responsáveis por induzir a divisão celular nos vegetais. Em 1955, foi identificada uma molécula que, na presença de auxina, induzia a divisão celular de tabaco (*Nicotiana tabacum*) em cultura de tecidos. Esta molécula foi então denominada “cinetina”, uma vez que causava a citocinese. Sequencialmente, Skoog e sua equipe propuseram o termo “citocininas” para os compostos com ação semelhante ou igual à da cinetina (PERES & KERBAUY, 2019; TAIZ et al. 2017).

Anos mais tarde, foi encontrada uma substância no endosperma imaturo de grãos de milho (*Z. mays*) que possuía atividade biológica semelhante à da cinetina. Quando adicionada ao meio de cultura, esta substância estimulava células maduras de plantas a se dividir, sendo então denominada zeatina (Z) (KALRA & BHATLA, 2018), devido ao nome científico do milho. Esta, revelou-se a citocinina encontrada de forma mais abundante nos vegetais.

A maior parte das citocininas naturais encontra-se em forma conjugada, sobretudo com moléculas de carboidratos como riboses, sendo estas, fisiologicamente inativas. As formas livres de citocininas são as que apresentam atividade fisiológica e são majoritariamente sintetizadas no meristema apical de raízes (KALRA & BHATLA, 2018).

2.3.3 Giberelinas

As giberelinas constituem um grupo com mais de 120 moléculas identificadas em plantas, fungos e bactérias, que têm em comum sua estrutura química básica. Dentre todas estas, porém, apenas um pequeno grupo apresenta bioatividade, enquanto as demais atuam apenas como precursores ou produtos de degradação (GUERRA & RODRIGUES, 2019; TAIZ et al, 2017).

As giberelinas foram descobertas devido à “doença da planta boba do arroz”, ou *bakanae*, em japonês. As plantas infectadas por esta doença apresentavam crescimento excessivo, ficando muito mais altas que as demais, com folhas esguias e de coloração amarelo-pálida e raízes atrofiadas, tornando-se mais suscetíveis a tombamentos, o que acarretava prejuízos à produção da semente (GUERRA & RODRIGUES, 2019). Analisando as plantas sintomáticas, em 1926, Eiichi Kurosawa descobriu que a doença era causada pelo fungo *Gibberella fujikuroi*, hoje renomeado como *Fusarium fujikuroi*, e que um produto químico secretado pelo fungo era o fator causal do crescimento anormal das plantas. Este produto foi

isolado de cultura de tecidos do fungo e identificado como giberelina (KALRA & BHATLA, 2018).

Na década de 50, a estrutura química da giberelina foi elucidada simultaneamente por dois grupos de pesquisa, um na Inglaterra e um nos EUA. Ao analisar as amostras, os dois grupos entraram em um consenso, denominando a substância encontrada como “ácido giberélico” (GA). Porém, na mesma época, pesquisadores de Tóquio isolaram três novas substâncias semelhantes, uma delas sendo equivalente ao ácido giberélico. Na década seguinte, quando um grande número de giberelinas foi isolado, verificou-se o quão vasto era este grupo e foi então estabelecido que as giberelinas deveriam ser identificadas por número, na ordem cronológica de descoberta e identificação, independentemente da origem (GUERRA & RODRIGUES, 2019).

Seus principais sítios de biossíntese são tecidos em rápido crescimento, como frutos em expansão, sementes em desenvolvimento e tecidos jovens do sistema caulinar. Juntamente às formas livres de giberelinas, as plantas apresentam formas conjugadas, sobretudo ligadas às moléculas de monossacarídeos como a glicose, sendo estas encontradas principalmente em sementes (GUERRA & RODRIGUES, 2019).

Das giberelinas identificadas, destacam-se GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇ por apresentarem função bioativa. Suas ações no desenvolvimento vegetal envolvem alongamento dos tecidos jovens, migração da fase juvenil à maturidade, desenvolvimento floral, determinação sexual em plantas dióicas, produção do fruto (*fruit set*) e germinação de sementes (KALRA & BHATLA, 2018).

2.3.4 Ácido abscísico

Na década de 60, acreditava-se que a dormência de gemas era causada por uma série de compostos inibidores sintetizados na planta em resposta às condições ambientais. Diversas tentativas foram feitas para tentar isolar estes compostos, e quando isolados, eram testados quanto à sua capacidade de inibição de crescimento. O primeiro deles foi identificado como “dormina”, por estar relacionado à supressão da brotação de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*), dormência de gemas de bétula (*Betula pubescens*) e abortamento de vagens de tremoço (*Lupinus arboreus*). Sequencialmente, foram encontradas em frutos de algodoeiro

(plantas do gênero *Gossypium* L.) duas substâncias que foram correlacionadas à sua abscisão, sendo denominadas “abscisina I” e “abscisina II” (KALRA & BHATLA, 2018).

Ao serem analisadas, as três substâncias foram identificadas como sendo o mesmo composto, que foi então nomeado como ácido abscísico (ABA) devido ao seu suposto envolvimento na abscisão dos frutos de algodão. Contudo, trabalhos posteriores demonstraram que o ácido abscísico promove a senescência, processo que precede a abscisão, em vez da abscisão em si (TAIZ et al, 2017).

O ABA é sintetizado em praticamente todas as células da planta, desde a coifa radicular até os meristemas apicais, mais precisamente, em células que contêm cloroplastos ou amiloplastos (KALRA & BHATLA, 2018). Suas ações no desenvolvimento vegetal estão relacionadas majoritariamente às respostas de estresse. Age como indicador de extremos de temperatura, estresse salino e déficit hídrico que resultam no fechamento estomático. Atua de forma indireta na heterofilia (produção de tipos foliares diferentes em um único indivíduo) (TAIZ et al, 2017). Nas sementes, promove seu amadurecimento, o acúmulo de proteínas e lipídios de reserva, a aquisição de tolerância à dessecação e a inibição da germinação precoce e a viviparidade. Atua também na cicatrização de ferimentos causados por herbivoria e danos mecânicos (STACCIARINI-SERAPHIN & FRESCHI, 2019).

2.3.5 Etileno

As primeiras observações dos efeitos do etileno foram feitas em 1858, quando George Fahnestock notou que o gás utilizado para iluminação pública afetava as árvores próximas aos postes, as quais perdiam suas folhas mais rapidamente. Somente quase 40 anos depois, em 1896, o etileno foi identificado como o composto ativo no gás responsável por essas respostas (BHATLA, 2018).

O etileno é um gás de estrutura química bastante simples e é produzido em todas as partes da planta, em maior ou menor taxa, a depender do tipo de tecido e de seu estágio de desenvolvimento. Diferentemente dos outros hormônios vegetais, não se conjuga com outras moléculas para armazenamento celular. Quando não é necessário, é simplesmente difundido para fora da planta (BHATLA, 2018; COLLI & PURGATTO, 2019).

Seus principais efeitos nos vegetais envolvem a abscisão de órgãos e o amadurecimento de frutos onde atua na quebra de amido em carboidratos solúveis, desenvolvimento de aroma e

mudança de cor. Além disso, atua na morte programada de tecidos e é um mediador de respostas adaptativas da planta aos fatores de estresse como ataque de patógenos, salinidade, seca e inundação, nesta última, induzindo a epinastia (TAIZ et al, 2017). É essencial também à quebra da dormência de gemas e sementes, pois estimula a taxa de respiração e mobiliza carboidratos (BHATLA, 2018).

2.3.6 Brassinosteroides

Em 1970, pesquisadores reportaram que o extrato bruto do pólen de colza (*Brassica napus*) continha substâncias que frequentemente promoviam o crescimento e rápido alongamento de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Estas substâncias foram identificadas como “brassininas” (BHATLA, 2018).

Por apresentar estrutura química semelhante aos esteroides animais, esta classe de compostos foi denominada brassinosteroides (BR). E dentre eles, foi identificado o que apresentava maior bioatividade, o epibrassinolídeo (EPI). Os brassinosteroides são encontrados em baixos níveis na maior parte dos órgãos da planta, como folhas, raízes e flores, e em níveis relativamente mais elevados no pólen, nas sementes imaturas e nos frutos (TAIZ et al, 2017).

No desenvolvimento vegetal, são essenciais para o crescimento, pois juntamente com os demais hormônios, regulam uma série de processos fisiológicos, tais como: expansão e divisão celular, fotomorfogênese, amadurecimento de frutos, desenvolvimento do tubo polínico, dos grãos de pólen e de sementes, acúmulo de açúcares e compostos antioxidantes e aumento da resistência aos estresses bióticos e abióticos (PEREIRA-NETTO, 2019).

2.3.7 Jasmonatos

Os jasmonatos são uma classe de compostos de origem lipídica, derivados do ácido jasmônico (AJ), e participam da regulação do crescimento vegetal. Nas plantas, foram detectados pela primeira vez nos óleos odoríferos das flores de jasmim (*Jasminum grandiflorum*), de onde deriva o nome dessa classe hormonal (PEREIRA-NETTO, 2019).

Atuam tanto na formação de tricomas - e em linhas similares, na formação das fibras do algodão - como substâncias odoríferas atrativas de polinizadores. Desempenham papel promotor na senescência e na interação e modulação de micorrizas. Induzem também a

produção de metabólitos secundários, sobretudo de alcaloides como nicotina, morfina, vimblastina, artemisina, glicosinato e antocianinas, além de desencadear a produção de proteínas de defesa, as quais interferem no sistema digestivo de herbívoros (BHATLA, 2018).

2.3.8 Ácido salicílico

O ácido salicílico (AS) é um composto de origem fenólica e recebe este nome por ter sido identificado pela primeira vez no salgueiro branco (*Salix alba*). Apresenta influência na progressão da senescência, no alongamento caulinar e na abertura estomática (BHATLA, 2018). Contudo, sua principal ação está relacionada ao sistema de defesa das plantas, atuando nos mecanismos de percepção do ataque de patógenos. Enquanto alguns insetos podem usar compostos químicos para anular o sistema de defesa das plantas para seu próprio benefício, as plantas também podem reconhecer esses compostos e posteriormente ativar respostas de defesa mais fortes para combater estes e outros invasores. Uma destas respostas inclui uma rápida acumulação de ácido salicílico, o que leva ao aumento da resistência às doenças (PEREIRA-NETTO, 2019).

2.4 ANÁLISE FITORMONAL

Cada vez mais torna-se evidente o fato de que os hormônios vegetais não atuam separadamente, mas que possuem efeitos fisiológicos altamente interativos e afetam a biossíntese e o metabolismo uns dos outros. Assim, tem crescido o interesse pelo “perfil hormonal” de uma amostra, o qual envolve uma análise conjunta e simultânea dessas moléculas. Isso, contudo, aumenta a complexidade analítica, pois requer uma metodologia que seja capaz de detectar moléculas de estrutura e natureza química diferentes, que são encontradas em quantidades ínfimas, geralmente em ng.g^{-1} de massa fresca (TARKOWSKÁ et al, 2014).

Os primeiros testes de detecção e quantificação fitormonal eram realizados através de bioensaios, que avaliavam os efeitos de um único composto sobre uma planta inteira ou um de seus órgãos isolado. Esses métodos, porém, são bastante específicos e limitados, além de serem demorados e possuírem baixa reprodutibilidade e precisão (VÖLKSCH, BUBLITZ & FRITSCH, 1989; DU, RUAN & LIU, 2012).

Por muitos anos, os bioensaios foram os únicos métodos de detecção e quantificação fitormonal, até o surgimento dos imunoenaios ou ensaios de imunoabsorção enzimática

(ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Estes, foram amplamente empregados devido à sua elevada sensibilidade e viabilidade econômica. Nos últimos anos, contudo, não têm sido tão utilizados para este fim, pois são incapazes de detectar simultaneamente múltiplas moléculas (SZÉKÁCS et al, 2000; DU, RUAN & LIU, 2012). Ou seja, não atendem à demanda pela caracterização do perfil hormonal nos tecidos.

Hoje, uma das técnicas mais utilizadas para a detecção simultânea de moléculas de baixa concentração como os fitormônios é a cromatografia líquida de ultra performance acoplada à detecção por espectrometria de massas em tandem (UPLC MS/MS, do inglês “*Ultra Performance Liquid Chromatography - tandem mass spectrometry*”). (GARIGHAN, 2017). Com esta técnica, pode-se separar uma mistura em seus componentes individuais e, simultaneamente, identificar e determinar a concentração de cada molécula alvo (MOREIRA, 2015).

A cromatografia é um método físico-químico que permite separar as moléculas de interesse, ou analitos, a partir de misturas complexas. Ela baseia-se nas propriedades da migração de substâncias (analitos) dissolvidas em uma fase móvel através de uma fase estacionária. O tempo dessa migração é variável e relacionado às interações entre os analitos e as fases móvel e estacionária (DEGANI, 2011).

A fase móvel é onde a amostra é dissolvida e seus componentes, quando isolados, movem-se por um solvente fluido. Já a fase estacionária é aquela por onde irá passar a fase móvel com a amostra, e onde o analito, em seu processo de separação ou identificação, irá fixar-se (MOTA, 2006; SOUZA, 2015). A fase móvel pode ser composta por um gás (cromatografia gasosa) ou por um líquido (cromatografia líquida). Já a fase estacionária pode ser composta por um material sólido ou por um líquido adsorvido a um sólido. A amostra é dissolvida em uma fração da fase móvel e é então impelida à fase estacionária. Esta passagem pode ser forçada, com a pressão de bombas como ocorre no cromatógrafo líquido (LC), ou ocorrer de forma espontânea, através de capilaridade, como na cromatografia de papel para acompanhamento da fermentação malolática em vinhos.

A associação da cromatografia líquida com detectores de massas tornou possível a criação de métodos de detecção de alta seletividade, sensibilidade e especificidade (KUSTER, 2006), permitindo não somente a separação dos analitos, como também sua identificação e quantificação. Estas caracterizações e quantificações pela espectrometria de massas envolvem

a identificação química das substâncias presentes na amostra através de suas massas moleculares na forma iônica (SOUZA, 2008).

Entretanto, antes da detecção e quantificação fitormonal propriamente dita, é necessária uma preparação minuciosa da amostra. Neste processo, são necessárias as etapas de extração, de purificação e de concentração do extrato hormonal. Dependendo da natureza do material vegetal que está sendo empregado, são necessários ajustes para garantir a detecção e quantificação dessas moléculas alvo.

Antes da extração, o material vegetal deve ser homogeneizado, rompendo as paredes celulares e permitindo que seu conteúdo interno seja extraível quando estiver em contato com um solvente apropriado (HARRISON, 2011). Nesta etapa, é indispensável o uso de frio para evitar as degradações enzimáticas ou químicas da amostra que possam interferir na quantidade dos fitormônios. Da mesma forma, o frio também é necessário durante a coleta de amostras, pois evita que ocorram não somente degradações, mas também modificações fisiológicas no tecido durante a amostragem, tais como respostas aos cortes ou às mudanças de temperatura.

A eficiência na extração de um hormônio dependerá de sua natureza química, polaridade, localização subcelular e até que ponto ele está associado aos demais compostos presentes no tecido, como fenóis, lipídeos, carboidratos, pigmentos ou proteínas (SAUNDERS & HILLMAN, 1978). Estas características devem ser levadas em consideração para a escolha do solvente apropriado a ser utilizado na extração.

Nesta etapa de extração, deve-se considerar também que, além dos fitormônios, há uma quantidade gigantesca de outros compostos no mesmo tecido vegetal e em concentrações muito maiores. Estes compostos adicionais podem diluir ou interferir nas futuras etapas de detecção e quantificação dos hormônios. Portanto, além da extração é também necessário separá-los dessas moléculas adicionais para facilitar sua detecção e evitar resultados ‘falsos negativos’ (DU, RUAN & LIU, 2012).

O método de purificação do extrato obtido depende do tipo de análise e do instrumento analítico empregado. Geralmente, a purificação é realizada em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), onde o extrato vegetal é vertido em colunas ou cartuchos plásticos que possuem finas camadas de materiais adsorventes. Estes, são geralmente compostos por hidrocarbonetos, materiais à base de carbono grafitado e matrizes de troca iônica. Quando o extrato vegetal é impelido a essas colunas, os fitormônios se ligam à fase sólida através de interações hidrofóbicas, polares ou iônicas. A coluna é então lavada com um solvente

apropriado, removendo as substâncias interferentes, e é empregado um eluente adequado, geralmente um álcool, que rompe as ligações formadas entre o material adsorvente e os fitôrmonios, proporcionando sua separação (LJUNG, SANDBERG & MORITZ, 2004; TARKOWSKÁ et al, 2014). O volume eluído da coluna de purificação é então concentrado através de secagem com nitrogênio (N₂) e é ressuspensado em uma solução compatível com a fase móvel empregada no cromatógrafo. Após essas etapas, a amostra está pronta para a análise propriamente dita.

2.5 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA FORMAÇÃO DA MUDA

O êxito na produção de uma muda depende sobretudo da formação de uma conexão vascular ativa entre o enxerto e o porta-enxerto. Embora não seja o único fator a ser observado, uma falha na formação desta conexão quase sempre leva à morte da planta. Isto porque junções incompletas ou não cicatrizadas criam fraquezas funcionais e estruturais na muda, que comprometem a vida útil da mesma (MELNIK, 2017; TEDESCO et al, 2022).

A formação dessa união é um processo bioquímico e estrutural que se inicia com a adesão do enxerto ao porta-enxerto, seguido pela formação de uma massa de tecido indiferenciado, no qual, será restabelecido o sistema vascular funcional entre eles. A nível molecular, essa reconexão requer uma reprogramação considerável da expressão gênica, da tradução de proteínas e do metabolismo nesse ponto de união (COOKSON et al 2013; PINA & ERREA, 2005).

Dado que a conexão bem-sucedida entre enxerto e porta-enxerto depende da reconexão de seus tecidos vasculares, é de se esperar que os mesmos hormônios e genes que regulam a formação vascular nos órgãos em desenvolvimento também regulem a regeneração vascular na enxertia. Contudo, é improvável que essa reconexão seja regulada de maneira idêntica à formação vascular (NANDA & MELNYK, 2018).

O processo de corte durante a enxertia rapidamente ativa as vias biossintéticas de etileno, ácido salicílico e ácido abscísico, hormônios responsivos aos danos mecânicos que ativam o processo de regeneração nos tecidos do enxerto e porta-enxerto. Na região do corte, as pectinas e outros constituintes de paredes celulares são depositados, servindo como a base cicatrizante e aderente entre ambas as partes. Pela ação conjunta das auxinas, citocininas e giberelinas, os tecidos internos do enxerto e do porta-enxerto se expandem para preencher a

lacuna entre as partes, gerando um acúmulo de células indiferenciadas denominado “calo” (MELNIK, 2017; NANDA & MELNYK, 2018; TEDESCO et al, 2022).

A partir da formação do calo, o enxerto e o porta-enxerto podem se comunicar por meio dos plasmodesmos dessa massa celular e os tecidos cambiais de ambas as partes iniciam o processo de regeneração. A diferenciação das células do calo em tecidos vasculares é induzida pela ação da auxina, formando os vasos de floema e xilema e proporcionando a conexão enxerto/porta-enxerto. A primeira conexão que se forma é nos vasos de floema, devido ao fluxo basípeto das auxinas, enquanto a formação dos vasos de xilema ocorre sequencialmente e é majoritariamente guiada pelas giberelinas (SHARNA & ZHENG, 2019).

Concomitantemente aos processos de calogênese e de vascularização, ocorre outro evento de grande importância para a qualidade da muda: o enraizamento do porta-enxerto. Diferentemente de como ocorre nos gêneros botânicos *Salix* e *Malus*, as plantas do gênero *Vitis* não possuem primórdios de raízes adventícias pré-formados nos ramos. Assim, as raízes adventícias surgem a partir de divisões celulares ao redor dos tecidos medulares (SMART et al, 2002). O início da formação de raízes adventícias depende majoritariamente dos antecedentes genéticos da variedade empregada como porta-enxerto, bem como da condição ambiental em que se encontra e dos níveis endógenos de hormônios e outros constituintes da estaca, como recursos nutricionais e reservas (STEFFENS & RASMUSSEN, 2016).

A indução da formação de raízes adventícias é dependente da relação entre auxinas/citocininas endógenas. Quando esta relação for maior (maior nível de auxina), ocorre um favorecimento na formação e emissão de raízes, enquanto que com uma baixa relação, o enraizamento é prejudicado. Quando as giberelinas e citocininas endógenas encontram-se em níveis muito maiores do que os de auxinas, a formação de raízes é inibida. Além das auxinas e citocininas, as estrigolactonas também estão envolvidas na regulação do processo de rizogênese (KERSTEN, 1987; LEONEL & RODRIGUES, 1993; SMART et al, 2002; STEFFENS & RASMUSSEN, 2016).

Um fator que pode influenciar diretamente na condição endógena da estaca, em termos nutricionais e hormonais, é sua época de coleta. Todos os ramos empregados como estacas na etapa de enxertia foram originados de gemas que brotaram na primavera, desenvolveram-se e tornaram-se lignificados durante o verão e entraram em estado de dormência com as primeiras ondas de frio no outono.

Se a coleta de estacas ocorrer no final do inverno, estas estacas provavelmente já terão acumulado uma soma natural de frio no campo suficiente para superar o estado de dormência. Entretanto, as estacas que são coletadas mais cedo, durante o final do verão e início do outono, também se desenvolveram de forma semelhante, mas não receberam uma exposição de frio natural em quantidade suficiente para ativar e superar plenamente a condição fisiológica de dormência. Isto as deixa com um status fisiológico distinto das estacas de coletas mais tardias e com isso, suas respostas ao processo de produção da muda serão diferentes (SMART et al, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Caracterizar a influência de diferentes datas de coleta de estacas e tempos de armazenamento em câmara fria sobre a qualidade fitotécnica e o perfil hormonal de mudas de videira após as etapas de forçagem e aclimatação;

3.2 ESPECÍFICOS

- Contribuir com o avanço do conhecimento nas respostas básicas de estacas de videira para o aprimoramento de protocolos de produção de mudas;
- Definir a importância do tempo de coleta e do período de armazenamento para a qualidade de mudas;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETATIVO, PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO FITOTÉCNICA DAS MUDAS

O experimento foi realizado nas dependências da Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves/RS, no ano de 2019. Foram empregadas as variedades Bordô (*V. labrusca*) como variedade copa, e Paulsen 1103 (híbrido *V. rupestris* X *V. berlandieri*) como porta-enxerto. Com esses genótipos foram realizados três tratamentos, sendo as estacas mantidas ou não em câmara fria conforme a combinação de tratamentos (datas de coleta x tempos de câmara fria), e sequencialmente enxertadas (Tabela 1).

No primeiro tratamento (T1), as estacas foram coletadas no dia 20 de junho e mantidas por dois meses em câmara fria. No segundo (T2), a coleta foi realizada no dia 22 de julho e as estacas mantidas por um mês em câmara fria. E no terceiro tratamento (T3), as estacas foram coletadas em 27 de agosto e não passaram por câmara fria (apenas com as condições térmicas do campo, monitoradas por estação meteorológica automática instalada próxima às plantas matrizes). As estacas de todos os tratamentos foram enxertadas no dia 28 de agosto.

Tabela 1. Tratamentos envolvendo a combinação de datas de coleta de estacas a campo (2019) e os tempos de armazenamento em câmara fria.

TRATAMENTO	COLETA	TEMPO DE CÂMARA FRIA	ENXERTIA
T1	20/junho	2 meses	
T2	22/julho	1 mês	28/agosto
T3	27/agosto	0 meses	

Para cada tratamento, foram coletadas aproximadamente 60 estacas de cada variedade, com cinco a sete entrenós cada, a partir de plantas matrizes dispostas no jardim clonal da Embrapa Uva e Vinho. Estas coletas foram realizadas entre as 08:00h e 10:00h da manhã, sendo as estacas organizadas em feixes e transportadas imediatamente até o setor de Casas de Vegetação da Embrapa.

Nas respectivas datas de coleta e logo após a retirada das plantas, as estacas foram esterilizadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% durante 10 minutos. Após o escorrimento e secagem natural, os feixes de estacas foram embalados com plásticos, selados com fita adesiva e armazenados em câmara fria (estabilizada previamente a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 2 meses (T1) ou 1 mês (T2). As estacas do T3 foram mantidas em temperatura ambiente (sem frio de câmara) até o momento de enxertia.

No dia 27 de agosto, as estacas de T1 e T2 foram retiradas da câmara fria e, juntamente com as estacas de T3, foram mantidas em pé e com a base submersa em recipiente com água durante 24h para hidratação até o momento da enxertia (28/agosto).

A técnica de enxertia empregada foi a de mesa, utilizando máquina semi-automática com corte tipo ômega (Ômega Star[®]), sendo preparadas 60 mudas em cada tratamento. Após a enxertia, as mudas foram parafinadas com cera comercial ACTYGREEF[®] (Quimiwax) e dispostas em caixas plásticas com vermiculita média-fina previamente umedecida. Estas caixas foram levadas até uma câmara de forçagem ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR}\geq 85\%$), onde permaneceram por 35 dias em condição de escuro. Após o período de forçagem, as mudas foram levadas até uma estufa composta de sombrite 70% ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR } 70\pm 2\%$) para aclimação, onde permaneceram por 10 dias.

Terminado o período de aclimação, as mudas foram retiradas da estufa e submetidas a uma avaliação fitotécnica. Nesta análise, foi registrado o número de mudas com formação de calo na zona de enxertia; o percentual do crescimento do calo, considerando 100% os calos que atingiram toda a circunferência em torno da zona de enxertia (soldadura); o número de mudas brotadas; e o desenvolvimento fenológico dos brotos. Este último parâmetro foi avaliado conforme escala adaptada de EICHORN & LORENZ (1977), descrito na Tabela 2. A muda era considerada “brotada” quando o broto do enxerto apresentava o estágio de desenvolvimento fenológico 5 ou superior e, quando inferior, foi considerada “não brotada”. Dentre as mudas brotadas, as que apresentavam desenvolvimento fenológico entre os estádios 5 a 8 eram consideradas como “desenvolvimento intermediário” e as em estádios superiores (9 a 12) como “desenvolvimento avançado”.

Após a avaliação fitotécnica, foi retirada a brotação e a cera de enxertia de cada muda, efetuando a raspagem com auxílio de canivete (Figura 2F). Das 60 mudas, foram aleatoriamente selecionadas 16, as quais, foram divididas em 4 repetições compostas de 4 mudas cada. De cada repetição, foram coletadas as porções do porta-enxerto (P), da zona do corte de enxertia (C) e do enxerto (E) (Figuras 1 e 2), sendo todos os tecidos congelados em nitrogênio líquido

imediatamente após o corte e armazenados em freezer (-20°C) até o momento do processamento, no laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Uva e Vinho.

Tabela 2. Escala utilizada para avaliação fenológica dos brotos. Adaptada de EICHORN & LORENZ (1977).

ESTÁDIO FENOLÓGICO	AVALIAÇÃO	FASE DO DESENVOLVIMENTO
 1	Não Brotada	gema dormente
 2		gema inchada
 3		abertura das escamas
 4		ponta algodão
 5	Brotada - Desenvolvimento Intermediário	ponta verde
 6		folhas visíveis em roseta
 7		1ª folha separada
 8	Brotada - Desenvolvimento Avançado	2ª folha separada
 9		3ª folha separada
 10		4ª folha separada
 11		5ª folha separada
 12		6ª folha separada

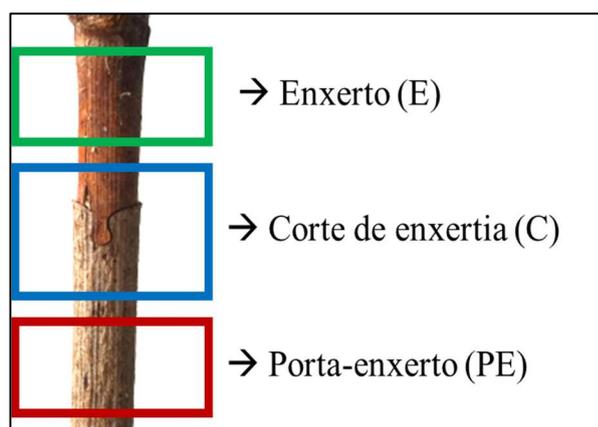


Figura 1. Porções da muda que foram utilizadas para amostragem de tecidos para a análise hormonal.

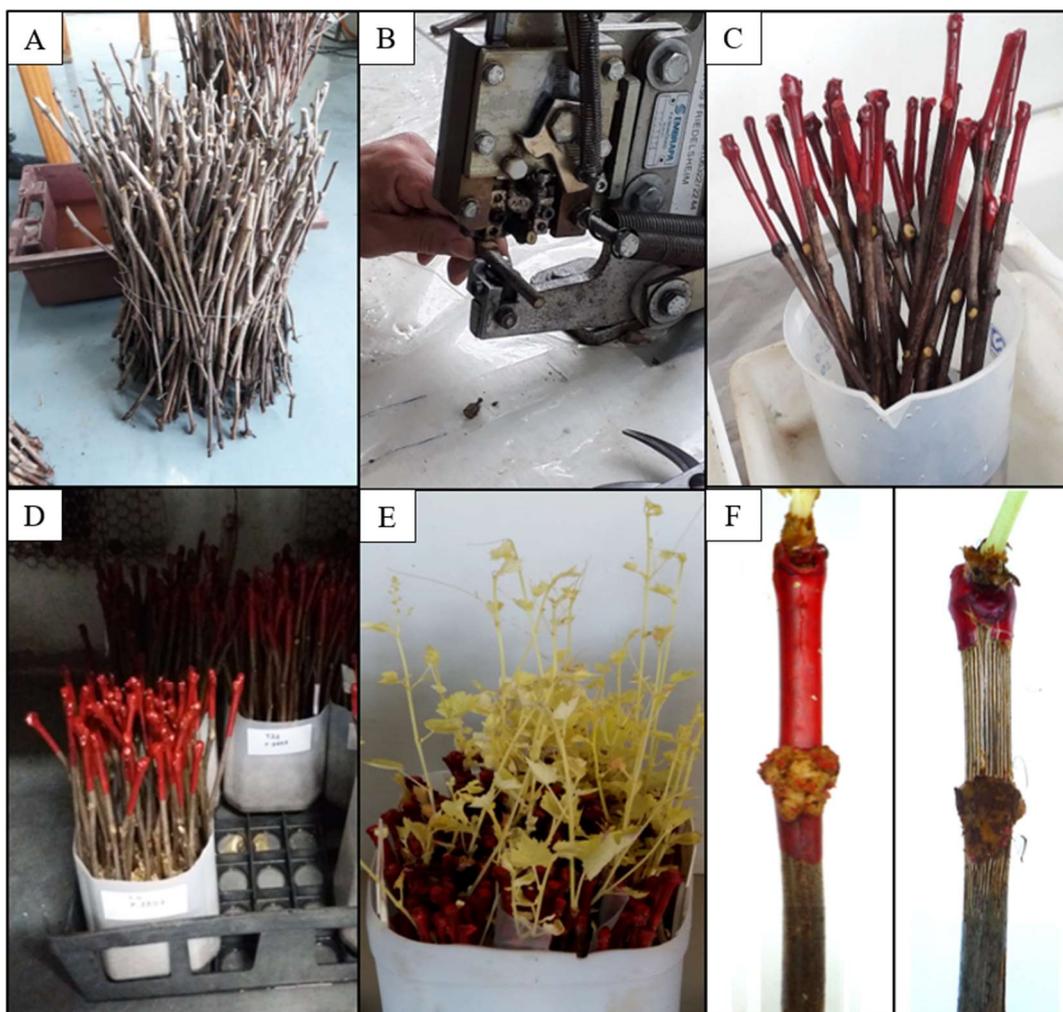


Figura 2. Sequência de etapas que foram empregadas na produção das mudas. Em (A) estacas coletadas; (B) enxertia das estacas com máquina; (C) mudas parafinadas; (D) mudas em câmara de forçagem; (E) mudas após o período de forçagem; e (F) detalhe da muda antes e após a raspagem da cera de enxertia.

4.2 PREPARO E EXTRAÇÃO HORMONAL DOS TECIDOS

As amostras de cada tecido, considerando a repetição de cada tratamento, foram moídas sem descongelamento prévio, empregando um criomoinho modelo Freezer/Mill 6870 da SPEX® SamplePrep até ser obtida uma textura de pó fino. Na sequência, foram pesadas 800mg de cada amostra e 100mg de uma mistura de sais de extração em tubos Falcon de 15mL. A mistura de sais era composta por sulfato de magnésio, cloreto de sódio, citrato trissódico desidratado e hidrogenocitrato dissódico, nas proporções 8:2:2:1 (*p/p/p/p*), respectivamente, segundo metodologia QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), proposta por PU et al. (2018).

Para iniciar a extração, em cada tubo Falcon com amostra e os sais, foram adicionados 4mL de solução de extração, composta por acetonitrila, metanol e ácido fórmico nas proporções 50:45:5 (v/v/v). Os tubos foram fechados, agitados em vórtex e mantidos por 24h sob agitação intermitente, empregando-se um agitador tipo gangorra (modelo Rocker 25 da Labnet International) mantido dentro de uma geladeira ($4\pm 1^\circ\text{C}$). No segundo dia, os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada Jouan BR4i a 6000rpm e temperatura de 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), sendo os sobrenadantes coletados em outro tubo. Foram adicionados mais 3mL da solução de extração ao precipitado das amostras e estas, mantidas novamente em agitação sob as mesmas condições e período de tempo do primeiro ciclo. No terceiro dia, os tubos foram novamente centrifugados, os sobrenadantes coletados e adicionados mais 3mL da solução de extração ao precipitado das amostras, que, nas mesmas condições, permaneceram mais 24h em agitação para o último ciclo de extração. No quarto dia, os tubos foram centrifugados pela última vez e os sobrenadantes coletados e reunidos em um único tubo, totalizando aproximadamente 10mL de extrato por amostra. A fim de evitar qualquer partícula que ainda estivesse em suspensão no extrato total das amostras, os tubos foram centrifugados uma última vez por 15min na mesma centrífuga e condições supracitadas, sendo o extrato final transferido para outro tubo (Figura 3). Todos os extratos foram estocados em freezer (-20°C) para as etapas seguintes da análise hormonal.

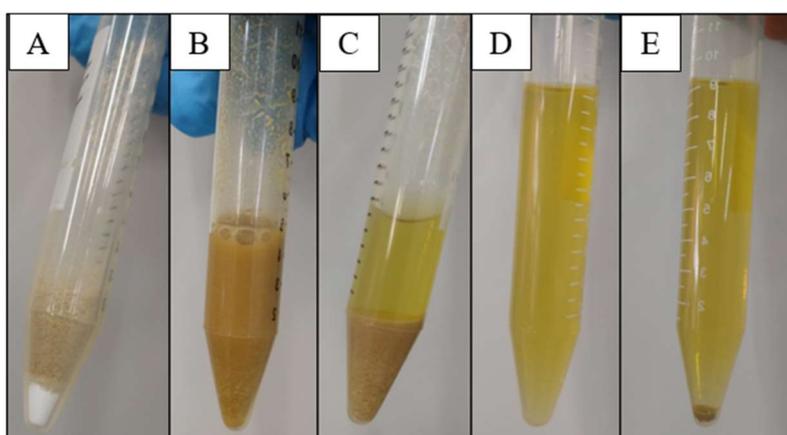


Figura 3. Fase inicial do protocolo de extração e detecção hormonal. Em (A) amostra com os sais de extração; (B) amostra com solução de extração; (C) tubo após a centrifugação; (D) sobrenadante coletado ao fim do terceiro dia de extração; e (E) sobrenadante após centrifugação final.

4.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS HORMONAIS

Os extratos de cada amostra foram concentrados em SpeedVac, modelo plus 5301, da Eppendorf[®], a 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), até atingir o volume final aproximado de 100 μL . Na sequência, em cada tubo de amostra concentrada foram adicionados 3mL de solução de ácido fórmico (1M). Esta ressuspensão foi aplicada gradualmente (1mL de cada vez) em coluna SPE Oasis MCX da Waters para purificação, sendo utilizada uma coluna para cada repetição e estas foram previamente ativadas, passando-se 3mL de metanol e 6mL de água purificada Milli-Q antes da aplicação dos extratos.

Uma vez nas colunas, as amostras foram eluídas em três etapas: na primeira, foram adicionados 2mL de solução de água:ácido fórmico (1M) para limpeza, descartando-se o eluído; na segunda, foram adicionados 2mL de metanol (100%) seguido por 1mL de água purificada Milli-Q; e, na terceira, com três concentrações crescentes de hidróxido de amônio (0,004M, 0,04M e 0,4M), sendo adicionados 2mL de cada concentração. Todos os eluídos da segunda e terceira etapa de cada amostra foram coletados e reunidos em um único tubo Falcon de 15mL, seguido de uma etapa de concentração em SpeedVac até volume final mínimo, de aproximadamente 50 μL .

No concentrado final de cada amostra, foram adicionados 100 μL de metanol 60% e o tubo agitado com auxílio de vórtex, a fim de permitir máxima solubilização de quaisquer resquícios da concentração que estivessem aderidos às paredes do tubo. Na sequência, foram adicionados 100 μL de água pura Milli-Q, ajustando a concentração final da ressuspensão para 70% água : 30% metanol, totalizando volume de aproximadamente 250 μL . Em testes precedentes, realizados para ajuste de método interno do Laboratório de Fisiologia Vegetal, esta concentração de ressuspensão (70% água : 30% metanol) foi a que apresentou os melhores resultados para a etapa seguinte de detecção e quantificação hormonal (dados não publicados).

As amostras concentradas e ressuspendidas foram então passadas em filtros 0,22 μm e dispensadas em vials com inserts de 300 μL (Figura 4), que corresponde à preparação final para a etapa de detecção e quantificação do perfil hormonal.

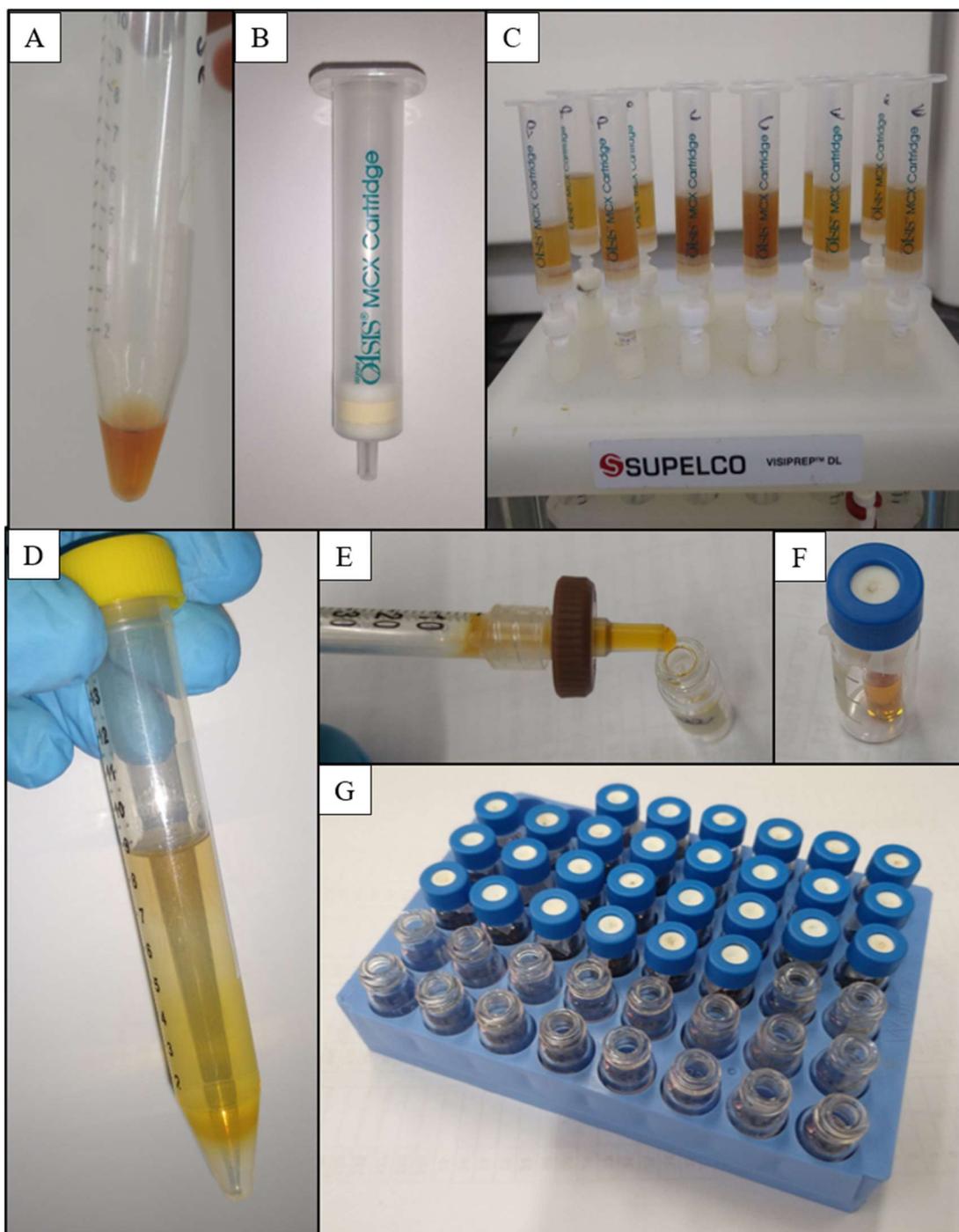


Figura 4. Sequência do protocolo de extração e detecção hormonal. Em (A) sobrenadante concentrado; (B) detalhe da coluna utilizada na eluição; (C) colunas com amostras no suporte; (D) eluído coletado; (E) filtragem do eluído concentrado e ressuspensão; (F) vial com amostra para leitura; e (G) placa do UPLC com a disposição dos vials para análise.

4.4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO HORMONAL

As amostras preparadas previamente (em vials) foram submetidas à detecção e análise quantitativa de nove hormônios vegetais: ácido indolacético (AIA), ácido giberélico 3 e 4 (GA₃ e GA₄), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA), epibrassinolídeo (EPI), zeatina (Z) e trans-zeatina-ribosídica (tZ-R). Nesta etapa foi empregado um cromatógrafo líquido de alta performance (Acquity™ UPLC System, Waters, USA) acoplado a um detector por espectrometria de massa do tipo triplo quadrupolo (MS Xevo™ TQ, Waters, USA).

O cromatógrafo UPLC era composto de um sistema de bomba quaternário, equipado com amostrador automático e refrigerado (4°C), onde os vials das amostras foram dispostos durante a análise. Para a separação cromatográfica foi empregado uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (Waters, EUA) (2,1 x 100mm, 1,7µm), em conjunto com uma pré-coluna Acquity UPLC BEH C18 (Waters, EUA) (2,1 x 5mm, 1,7µm).

A fase móvel consistiu de uma mistura binária do eluente A (Água + 0,1% de Ácido Fórmico + 1mM de Acetato de Amônio) e do eluente B (Acetonitrila + 0,1% de Ácido Fórmico + 1mM de Acetato de Amônio). O gradiente de eluição variou de modo linear de 1% do eluente B (condição inicial) até 100% do eluente B aos 6 minutos, sendo mantido assim até 8 minutos, retornando para condição inicial de 1% de B em 8,1 minutos e estabilizando até 9,5 minutos. O fluxo empregado foi de 0,3mL.min⁻¹, mantendo a temperatura da coluna constante em 40°C. Foi aplicado um volume de injeção de 15µL de amostra em todas as análises.

Para detecção foi utilizado um sistema de espectrometria de massa do tipo triplo quadrupolo (Waters, modelo Xevo™ TQ), equipado com a interface eletrospray (ESI) e ajustado com as seguintes condições: tensão capilar, 2,7kV; temperatura da fonte, 150°C; temperatura de dessolvatação, 500°C; fluxo do gás de dessolvatação (Nitrogênio), 900L.h⁻¹; fluxo de gás no cone (Nitrogênio), 40L.h⁻¹; e fluxo do gás de colisão (Argônio), 0,2mL.min⁻¹.

Na detecção foi empregado o modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), cujos parâmetros de detecção da massa-carga (m/z) foram previamente otimizados para cada hormônio, considerando, respectivamente, os dados de transição de fragmentação (m/z), voltagem do cone (V), voltagem de colisão para fragmentação (V), modo de ionização por ESI (positivo ou negativo) e tempos de retenção (minutos), respectivamente para: ABA (263>153, 20V, 12V, negativo, 3,92 min), AS (137>93, 25V, 13V, negativo, 3,63 min); AJ (209>59, 24V, 13V, negativo, 4,71 min), GA3 (345>239, 30V, 14V, negativo, 2,78 min), GA4 (331>257, 30V,

22V, negativo, 5,37 min), Z (220>136, 25V, 18V, positivo, 2,87 min), tZ-R (325>220, 25V, 22V, positivo, 3,24 min), AIA (176>130, 18V, 12V, positivo, 5,01 min), AIA-d2 (178>132, 18V, 12V, positivo, 5,01 min) e EPI (481>445,1, 20V, 10V, positivo, 5,93 min).

Para a curva padrão, foram pesadas com precisão as amostras dos padrões Sigma-Aldrich de ABA (A1049), AS (S5922), GA3 (G7645), GA4 (G7276), AJ (J2500), AIA (I2886), AIA-d2 (492817), Z (Z0164), tZ-R (Z3541) e EPI (E1641). Estes padrões foram dissolvidos inicialmente em metanol para preparação da solução estoque ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), armazenados em baixa temperatura (-20°C) e em frascos protegidos da luz. Imediatamente antes da utilização, as soluções estoques foram diluídas em série, na mesma solução de ressuspensão que foi empregada com as amostras (70% água : 30% metanol), seguindo as concentrações de 0, 5, 10, 20, 80, 160, 320, 640 e $1280\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada concentração foi preparada em três repetições independentes (vial separado), para o cálculo da variabilidade do preparo/detecção. Para a quantificação, foram respeitados os limites de detecção (LOD, superior a 3) e de quantificação (LOQ, superior a 10) para a razão sinal/ruído de cada hormônio, utilizando o software TargetLynx™ (Waters, EUA). Para determinar a eficiência de recuperação e o efeito da matriz, considerou-se a adição (spike) de 1000ng de cada padrão em amostras independentes de cada experimento e tecido no início da extração. A recuperação e o efeito da matriz foram determinados pela comparação das áreas de pico do padrão analítico acrescido antes e após a extração.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos na avaliação fitotécnica para os parâmetros de número de mudas com formação de calo, percentual de crescimento do calo e o número de mudas brotadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$) utilizando-se o software Assistat v. 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2016).

Os dados quantitativos de cada hormônio, considerando os respectivos tratamentos e repetições, foram submetidos à uma análise estatística não-paramétrica, por meio do teste Qui-quadrado ($p<0,05$), seguido do teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes para comparação de médias, utilizando o software R, pacote *Agricolae* (R CORE TEAM, 2020).

Nos resultados da quantificação hormonal, a análise estatística foi executada de duas formas: comparando os valores das regiões de um mesmo tratamento, ou seja, P x C x E de T1; P x C x E de T2; e P x C x E de T3; e comparando os valores de uma mesma região entre os

tratamentos, ou seja, P de T1 x P de T2 x P de T3; C de T1 x C de T2 x C de T3; e E de T1 x E de T2 x E de T3.

5. DISCUSSÃO E RESULTADOS

Ao longo do período hibernar de 2019, entre os meses de maio a setembro, houve um somatório de 343 horas de frio (HF), sendo registrado um maior acúmulo nos meses de julho e agosto. Este frio acumulado a campo foi inferior à Normal Climatológica para a região de Bento Gonçalves, que é de 403HF (EMBRAPA, 2022).

Durante o período de coleta das estacas para o experimento (junho a agosto) foi acumulado um total de 304HF. Contudo, salienta-se que as estacas de cada tratamento tiveram acúmulos distintos de HF a campo, devido às diferentes datas de coleta. Enquanto a coleta de agosto (T3) teve um acúmulo de 304HF, mais próximo ao total contabilizado no ano, a coleta de julho (T2) teve 157HF e a coleta de junho (T1) apenas 6HF contabilizadas à campo (Figura 5).

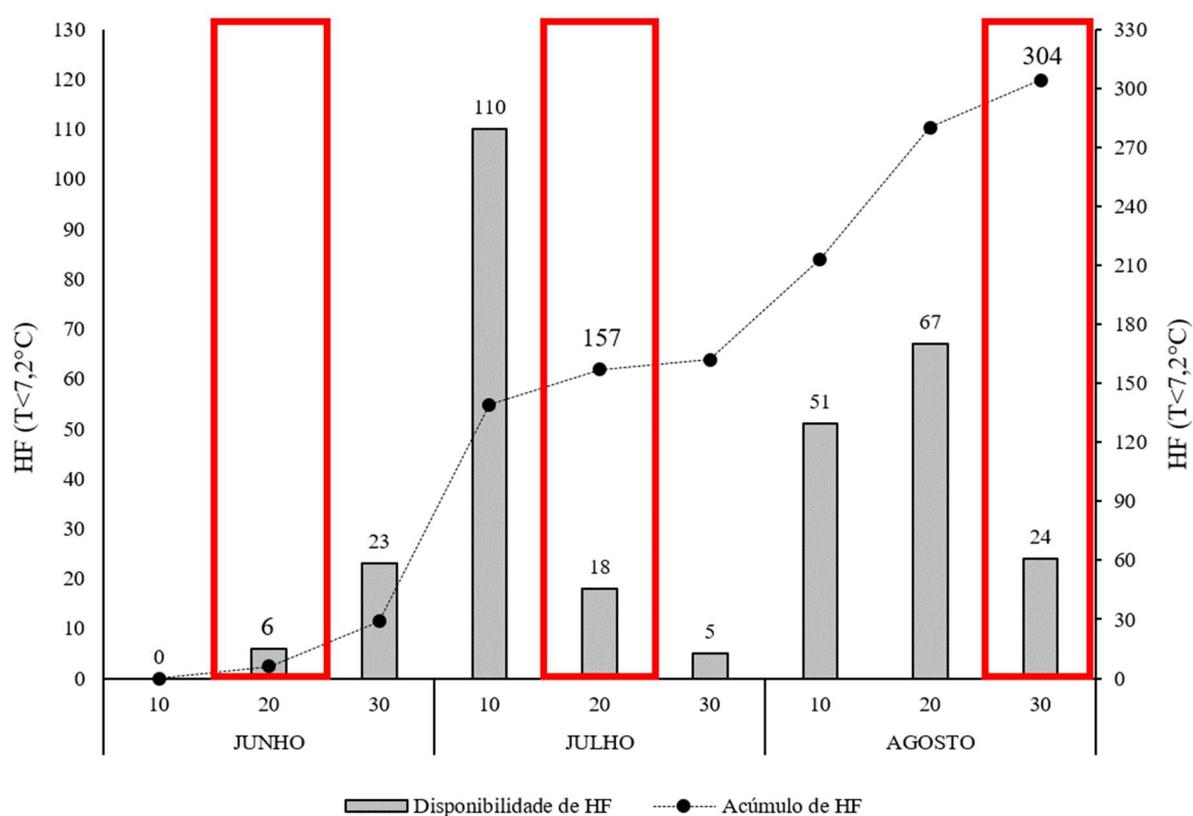


Figura 5. Acúmulo e disponibilidade de HF ($T \leq 7,2^{\circ}\text{C}$) entre os períodos dos dias 10, 20 e 30 dos meses de junho (T1), julho (T2) e agosto (T3) de 2019, em Bento Gonçalves/RS. Destaques em vermelho representam os momentos aproximados das datas de coleta das estacas a campo.

Na contagem de HF para as videiras é importante considerar dois pontos-chave, os quais correspondem à indução e à superação da dormência das gemas ou endodormência (PERUZZO et al., 2014). A indução ocorre com os primeiros dias frios do outono, que são percebidos pela planta e ativam a paralisação dos processos de desenvolvimento vegetativo, preparando-se para o estado de dormência propriamente dito (ativação da endodormência). O segundo ponto representa o acúmulo máximo de HF ou a demanda que o genótipo precisa para superar o estado de dormência (saída da endodormência), reativando os processos metabólicos da planta e preparando-a para o novo ciclo de desenvolvimento.

Quando estes marcos de demanda em HF são contemplados, a planta entra no estado de ecodormência, aguardando apenas que as condições ambientais se tornem adequadas para o início da brotação, como temperaturas mais elevadas e disponibilidade hídrica. Entretanto, se a disponibilidade de HF para o ponto de indução à endodormência não for suficiente, a planta apresenta uma ativação parcial e segue em desenvolvimento vegetativo ao longo do período de outono, se as condições hídricas e térmicas permitirem. Além disso, se a ativação for completa com as primeiras HF de outono, mas o acúmulo de HF ao longo do período hibernar não atingir a necessidade do genótipo, a superação da endodormência será insuficiente e a planta terá problemas como atrasos e desuniformidades na brotação (ANZANELLO, FIALHO & SANTOS, 2018). Na evolução do estado de endodormência também se destaca o efeito da alternância entre períodos de frio e calor ao longo do período hibernar. Isso também é prejudicial para a superação da endodormência e, conseqüentemente, para a brotação, dado que as temperaturas elevadas reverterem os efeitos do frio acumulado (ANZANELLO et al, 2014).

Analisando as demandas de HF da cultivar ‘Bordô’, BENATI et al (2017) destacam que esse genótipo necessita de apenas 10 HF para a indução e 90 HF para a superação da endodormência. Desta forma, salienta-se que o baixo acúmulo de frio registrado a campo na primeira data de coleta (T1) foi suficiente apenas para uma ativação parcial da endodormência das gemas dessa cultivar. Contudo, uma vez que as estacas foram mantidas em câmara fria por 2 meses sob regime constante de baixa temperatura (3°C), totalizando um acumulado aproximado de 1440 HF em ambiente controlado, a demanda de frio certamente foi suprida. Da mesma forma, em T2, apesar de ter acumulado a campo 157HF (que é superior à demanda desse genótipo), o frio controlado suplementar de 30 dias (~720HF adicionais) também anularia qualquer efeito negativo de ondas de calor que possam ter ocorrido até o momento da coleta dessas estacas. Em contrapartida, as estacas de T3, pelo fato de não passarem pelas condições

de frio controlado na câmara fria, refletem apenas a influência do frio acumulado à campo (304 HF) e também, das reais condições meteorológicas do período.

Na avaliação fitotécnica das mudas (Figura 6), nos três tratamentos, o percentual de mudas com calo foi superior a 95%, ou seja, sem muita diferença entre as datas de coleta e condições de frio, atingindo a média geral de 57 mudas com calo na zona de enxertia dentre as 60 mudas de cada tratamento. Contudo, as maiores variações entre os tratamentos ocorreram no percentual médio de soldadura das mudas com calo e no percentual de mudas brotadas nos tratamentos.

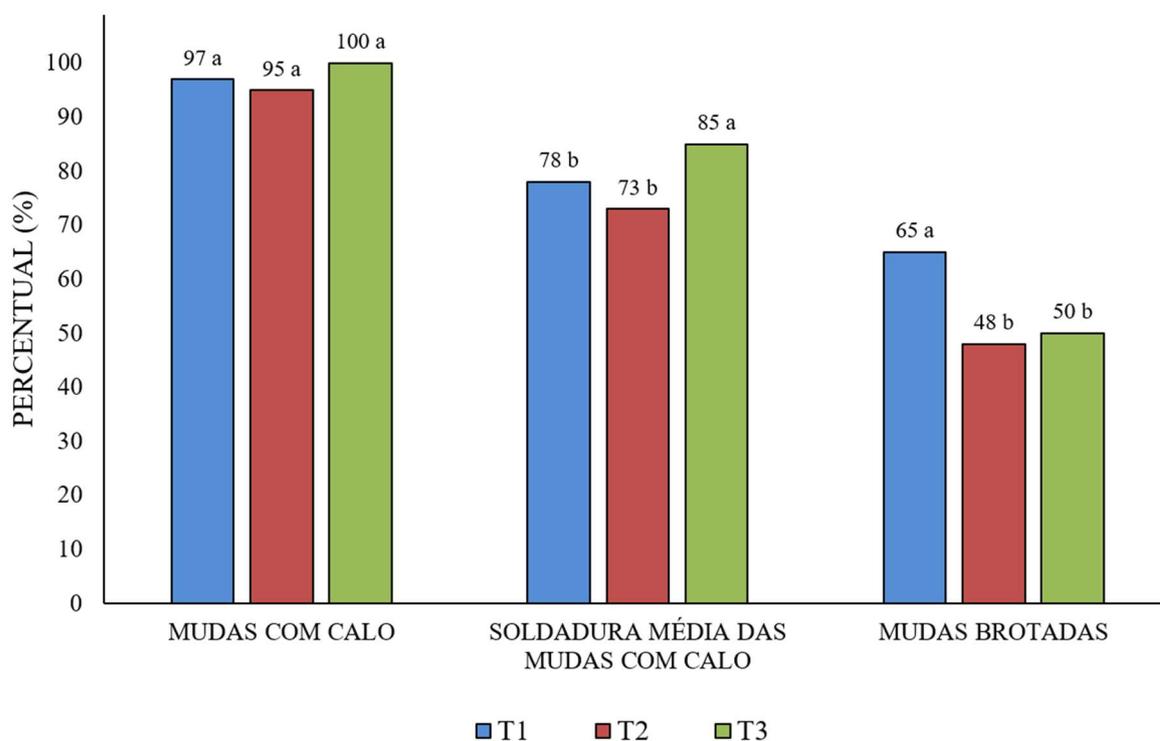


Figura 6 - Resultados das avaliações fitotécnicas: mudas com calo (%), soldadura média das mudas com calo (%) e mudas brotadas (%) nos tratamentos. A muda era considerada brotada quando o broto apresentava desenvolvimento fenológico igual ou superior ao estágio 5 da Tabela 2. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Quanto à soldadura, que corresponde à proporção de desenvolvimento do calo em relação ao contorno da zona de enxertia, percebe-se que T3 atingiu um valor médio superior (85%), em comparação a T1 (78%) e T2 (73%) (Figura 6). Contudo, mesmo que a formação de calo tenha sido elevada (>70%) nas mudas destes tratamentos, os calos não cobriram

completamente a zona do corte de enxertia, permanecendo uma faixa média de 15 a 27% da circunferência sem a presença de novas células. Este fato pode influenciar negativamente a qualidade da muda, pois esta uniformidade na calogênese também define a uniformidade na formação e desenvolvimento dos novos feixes vasculares (SHARNA & ZHENG, 2019), podendo comprometer a estabilidade da conexão e acarretar problemas futuros para as plantas.

Na análise da brotação das mudas (gema do enxerto), o mais favorável foi a condição com maior tempo de câmara fria, pois o maior valor foi registrado em T1 (65%, 39 mudas) (Figura 6), apresentando brotos com estágio de desenvolvimento fenológico igual ou superior a 5 (Tabela 3). Já em T2 e T3 as brotações foram similares, atingindo 48% (29 mudas) e 50% (30 mudas), respectivamente.

Apesar dos baixos percentuais de brotação, estes valores foram próximos da realidade média obtida pelo setor de produção de mudas (KUHN, REGLA & MAZZAROLO, 2007). Além disso, destaca-se que nenhum dos tratamentos proporcionou maior homogeneidade no desenvolvimento fenológico dos brotos, com mudas variando entre as faixas de não-brotação (1 a 4), desenvolvimento intermediário (5 a 8) e desenvolvimento mais avançado (9 a 12) (Tabela 3).

Dentre as mudas não brotadas, a maior proporção se encontrava no estágio 1 (gema dormente) em todos os tratamentos. Contudo, nas mudas brotadas, destaca-se que em T1 a maior proporção se encontrava no estágio 7 (1ª folha separada), enquanto em T2 e T3, a maior parte das mudas já estava no estágio 9 (3ª folha separada). Ou seja, T1 apresentou um desenvolvimento intermediário em comparação com os demais tratamentos. Em T2, a maior parte das mudas estava dividida entre os estágios de não-brotação e de desenvolvimento mais avançado. Já T3 teve distribuição semelhante na avaliação do desenvolvimento fenológico, com valores similares de brotação e não-brotação e número próximo de mudas em desenvolvimento intermediário e desenvolvimento mais avançado. Portanto, o frio a campo contribuiu positivamente para o desenvolvimento fenológico dos brotos nas mudas de T2 e T3. Os quais, mesmo com elevado número de mudas não brotadas, apresentaram maior número de mudas com antecipação da brotação e desenvolvimento fenológico mais avançado.

Tabela 3. Avaliação do desenvolvimento fenológico dos brotos. Avaliação conforme Tabela 2.

ESTÁDIO FENOLÓGICO	AVALIAÇÃO	NÚMERO DE PLANTAS		
		T1	T2	T3
1	Não Brotada	9	13	10
2		0	1	5
3		4	7	9
4		8	10	6
TOTAL		21 (35%)	31 (52%)	30 (50%)
5	Brotada	5	3	0
6		10	0	1
7	Desenvolvimento Intermediário	11	3	9
8		1	0	3
TOTAL		27 (45%)	6 (10%)	13 (22%)
9	Brotada	6	9	11
10		1	0	0
11	Desenvolvimento Avançado	3	8	3
12		2	6	3
TOTAL		12 (20%)	23 (38%)	17 (28%)

Considerando de forma geral os parâmetros avaliados, T3 apresentou os melhores resultados, dado que obteve os maiores percentuais de calogênese e soldadura, mesmo que com taxa de brotação inferior a T1 e menor homogeneidade no desenvolvimento fenológico que T2.

Na análise do perfil hormonal, destaca-se que os resultados variaram conforme o tipo de hormônio, o tratamento e a porção da muda que foi analisada (Figuras 7, 8, 9 e 10). Nas condições deste ensaio, salienta-se que os hormônios EPI e GA₄ não foram detectados e, portanto, desconsiderados na avaliação. Além disso, observou-se que os níveis de ABA e GA₃, foram variáveis entre as porções da muda e pouco relacionados com os tratamentos de épocas de coleta e tempos de câmara fria (Figura 7). Em contrapartida, os maiores níveis de AJ foram encontrados em T1 (coleta mais antecipada de estacas), sobretudo na região do corte de enxertia e do enxerto, enquanto AS seguiu uma tendência contrária, com maiores níveis no enxerto e nos tratamentos T2 e T3 (Figura 8).

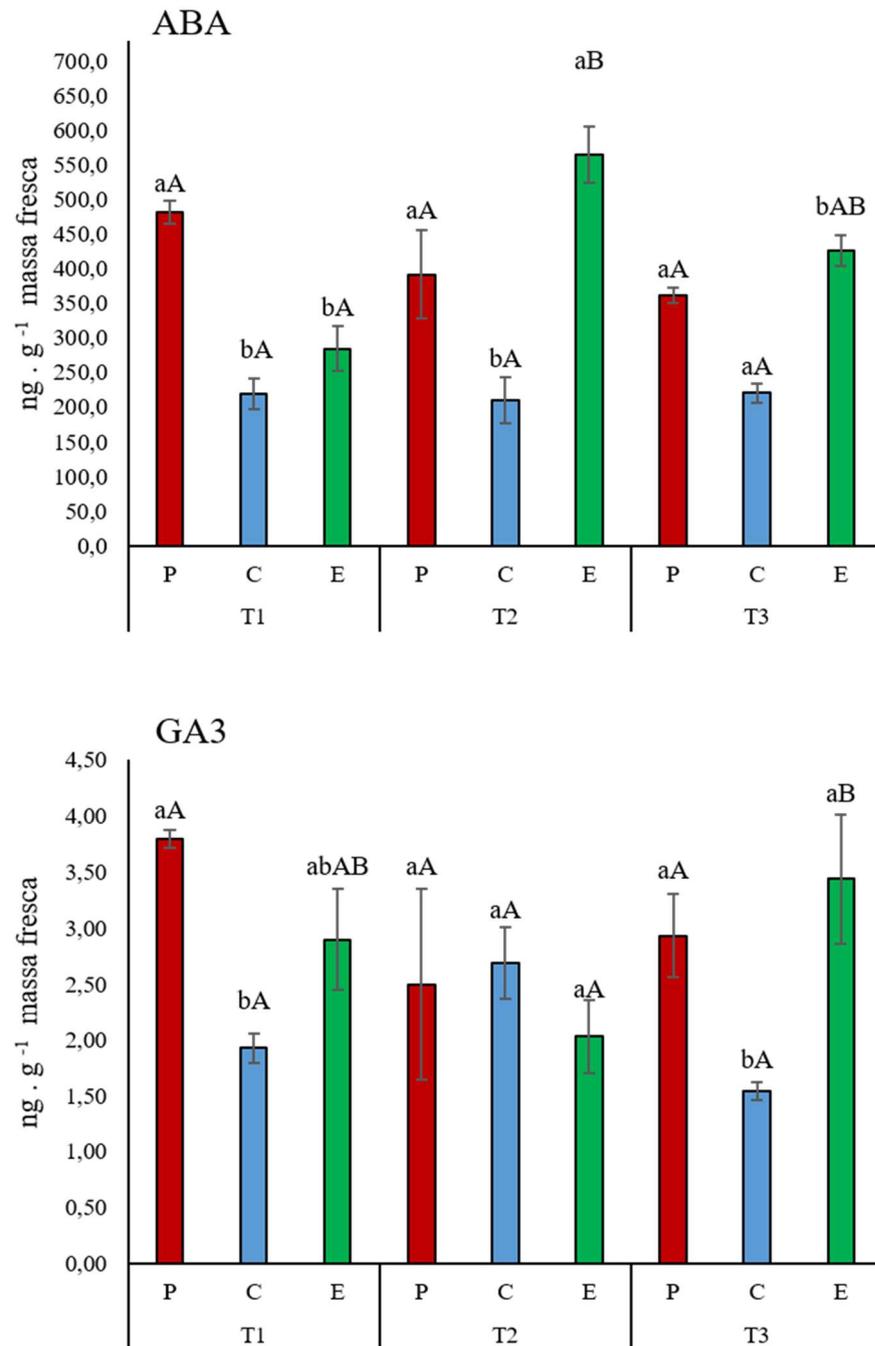


Figura 7. Gráficos de barras das concentrações (ng.g⁻¹ massa fresca) de ABA e GA₃ determinadas nas regiões do porta-enxerto (P), corte de enxertia (C) e enxerto (E) das mudas nos diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre regiões (P, C e E) e letra maiúscula entre tratamentos (data de coleta) pelo teste Kruskal-Wallis (p<0,05).

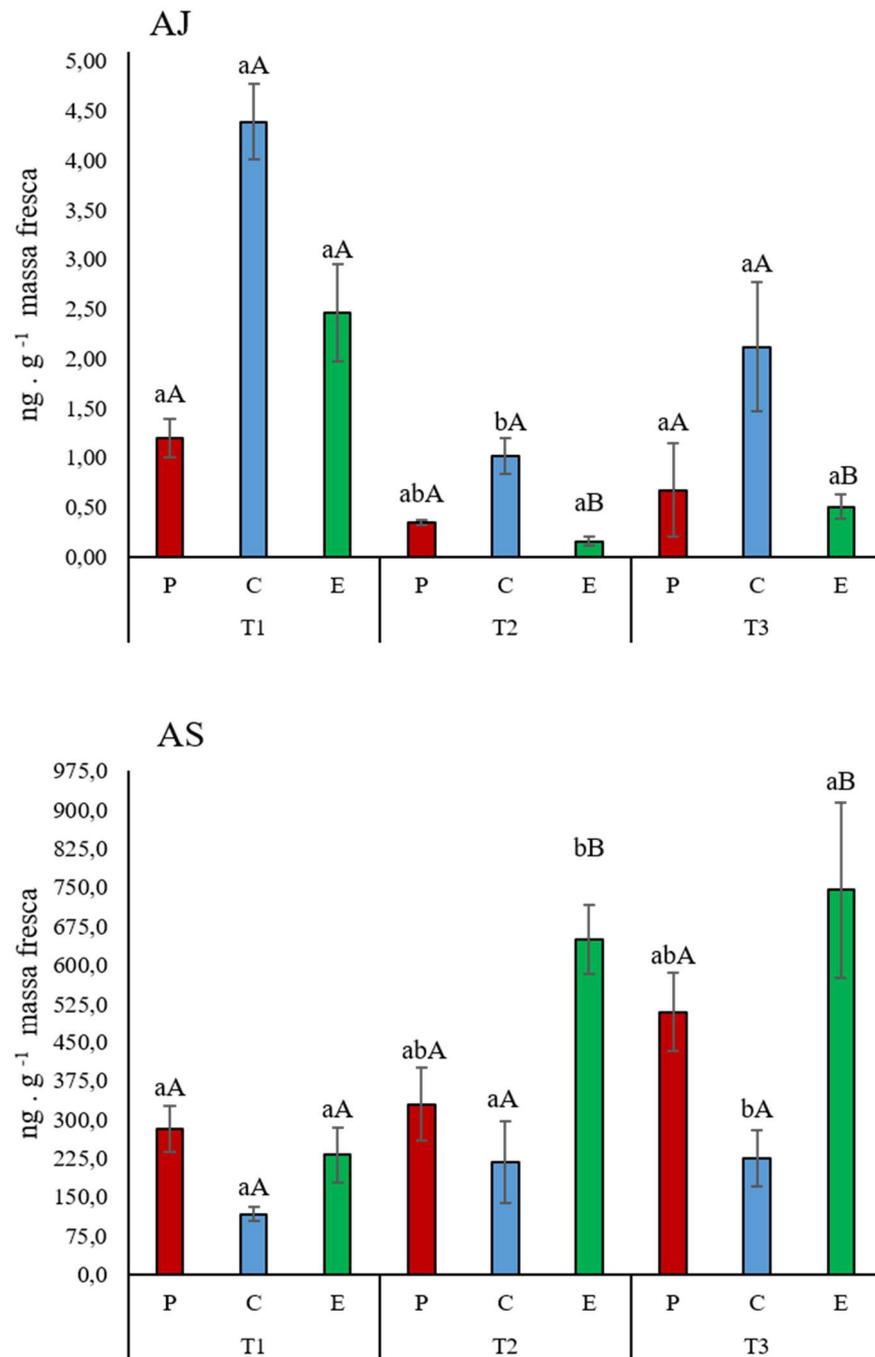


Figura 8. Gráficos de barras das concentrações (ng.g⁻¹ massa fresca) de AJ e AS determinadas nas regiões do porta-enxerto (P), corte de enxertia (C) e enxerto (E) das mudas nos diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre regiões (P, C e E) e letra maiúscula entre tratamentos (data de coleta) pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

As ações do ABA e do AS estão diretamente ligadas às condições de estresse. Normalmente, a resposta das plantas pelo AS em relação ao dano físico é um rápido aumento de sua concentração no órgão lesionado (PEREIRA-NETTO, 2019). O ABA atua também na cicatrização de danos mecânicos, mas é um hormônio que atua como antagonista em muitos outros processos e, por isso, se apresenta de forma mais uniforme nos tecidos da planta (STACCIARINI-SERAPHIN & FRESCHI, 2019). Estes dois hormônios apresentaram picos em E, por ser justamente a porção da muda que passou por uma raspagem com canivete para retirada da cera de enxertia. E novamente, os maiores valores foram observados em T2 e T3, que se apresentaram com maior nível de atividade metabólica em relação à T1. Mesmo que a coleta de amostras tenha sido feita logo após a raspagem da cera, as lesões podem ter desencadeado a síntese destes hormônios.

Quanto à variação de AJ, um fator que explica o contraste nos níveis entre as datas de coleta é a relação antagônica que este hormônio apresenta com AS (Figura 8). No comparativo dos tratamentos e das porções na muda, a concentração dos dois hormônios é claramente oposta, dentro de suas faixas de concentração. Segundo CAARLS et al. (2015), esse efeito antagônico se deve ao fato dos níveis de AS induzirem alterações redox no tecido que modificam a regulação transcricional e a supressão de genes dependentes de AJ.

A maior presença de AJ nos tecidos também tem sido associada aos mecanismos de defesa secundária das plantas, em resposta a estresses bióticos e abióticos, e não tem sido considerado um elemento essencial aos eventos fisiológicos que ocorrem durante a enxertia e a formação da muda (NANDA & MELNIK, 2018). Portanto, este resultado comprova que as estacas de T1, com maior concentração de AJ (Figura 8), estavam em condições mais estressantes que as estacas das demais coletas, justificando o atraso na evolução fenológica dos brotos (Tabela 3). Possivelmente, pelo fato de terem sido cortadas e estocadas em câmara fria antes da indução completa da endodormência, as estacas não haviam entrado naturalmente em dormência no campo e as gemas permaneceram mais responsivas ao aumento de temperatura, atingindo maior brotação (T1 foi 65%, enquanto T2 e T3 atingiram 48% e 50%, respectivamente, Figura 6). Contudo, como no momento da coleta as gemas ainda não estavam totalmente preparadas para receber o frio da câmara fria, a condição de T1 promoveu uma situação de estresse e de restrição metabólica para as estacas de videira. Em contrapartida, os níveis de AS, caracterizam uma resposta mais adequada das gemas ao acúmulo do frio, sendo que o incremento de AS tem sido associado à antecipação da superação de dormência em videira (ORRANTIA-ARAUJO et al, 2020). Portanto, isso explica a maior antecipação dos

estágios fenológicos registrada nas brotações das mudas em T2 e T3, comparado com T1 (Tabela 3).

Outro ponto relevante é que as variações nos níveis de AJ são muito inferiores às mudanças nos níveis de AS, o que também corrobora com os contrastes metabólicos entre as mudas de T1, T2 e T3. Uma maior concentração de fitormônios significa que o tecido avaliado se encontra metabolicamente mais ativo (TAIZ et al, 2017), e um tecido metabolicamente mais ativo é também mais sensível e perceptível às modulações externas, respondendo de forma mais rápida às mudanças ambientais.

De forma geral, os níveis de AS, Z, tZ-R e AIA foram encontrados em menores concentrações na coleta mais precoce de estacas (T1), enquanto que nas coletas seguintes (T2 e T3) suas concentrações foram maiores, com uma tendência de maior acúmulo nas porções do enxerto (E) e do corte de enxertia (C) (Figuras 8, 9 e 10). Há também certa tendência de maior concentração destes hormônios nas amostras de T2 (coleta em julho e 30 dias de câmara fria), mas a variabilidade é alta e não houve contrastes significativos com as amostras de T3 (coleta em agosto e sem câmara fria).

Os teores de Z, que é a forma bioativa desta citocinina, foram muito menores que os níveis de tZ-R, que corresponde à forma conjugada de transporte e armazenamento (Figura 9). Em geral, as citocininas podem ser sintetizadas em todos os tecidos da planta, apesar de serem produzidas majoritariamente nos meristemas apicais das raízes e serem transportadas para as demais partes da planta, principalmente para o controle do crescimento equilibrado da parte aérea em relação à raiz. Nesse fluxo de distribuição na planta, a Z é conjugada com moléculas de carboidratos e são transportadas pelos vasos de xilema até o tecido alvo, onde são hidrolisadas para sua forma bioativa (PEREZ & KERBAUY, 2019). A conjugação é também uma forma de controle do efeito ativo do hormônio e pode, portanto, explicar os contrastes que foram observados entre os níveis de Z e tZ-R no período pós-forçagem. Como a região do corte de enxertia (C) apresenta elevada taxa de divisão celular durante a formação do calo e das seguintes conexões entre enxerto e porta-enxerto, é provável que as moléculas bioativas de zeatina tenham sido direcionadas para a forma conjugada ou sendo liberadas de modo gradativo e conforme a demanda.

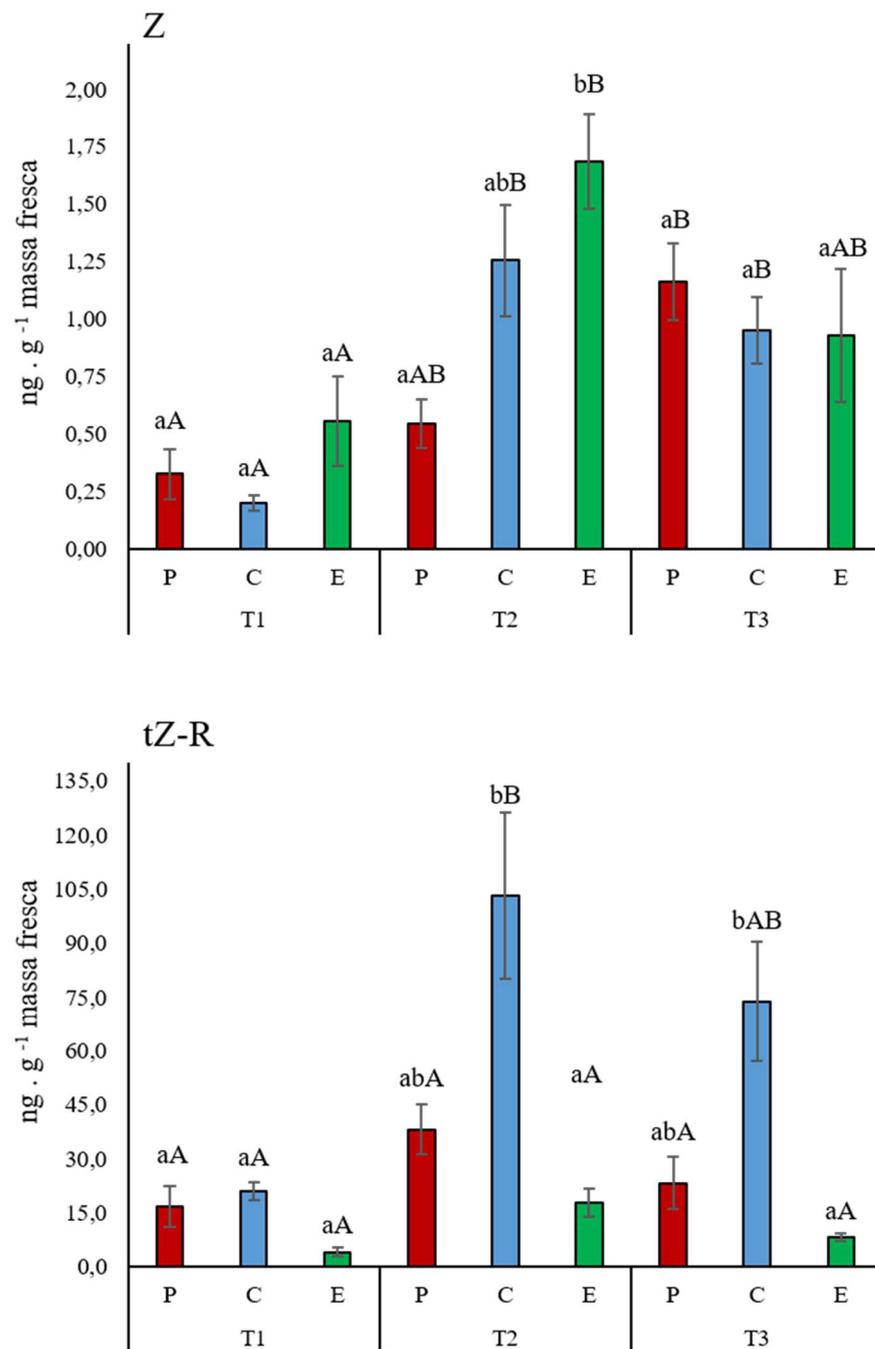


Figura 9. Gráficos de barras das concentrações (ng.g⁻¹ massa fresca) de Z e tZ-R determinadas nas regiões do porta-enxerto (P), corte de enxertia (C) e enxerto (E) das mudas nos diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre regiões (P, C e E) e letra maiúscula entre tratamentos (data de coleta) pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

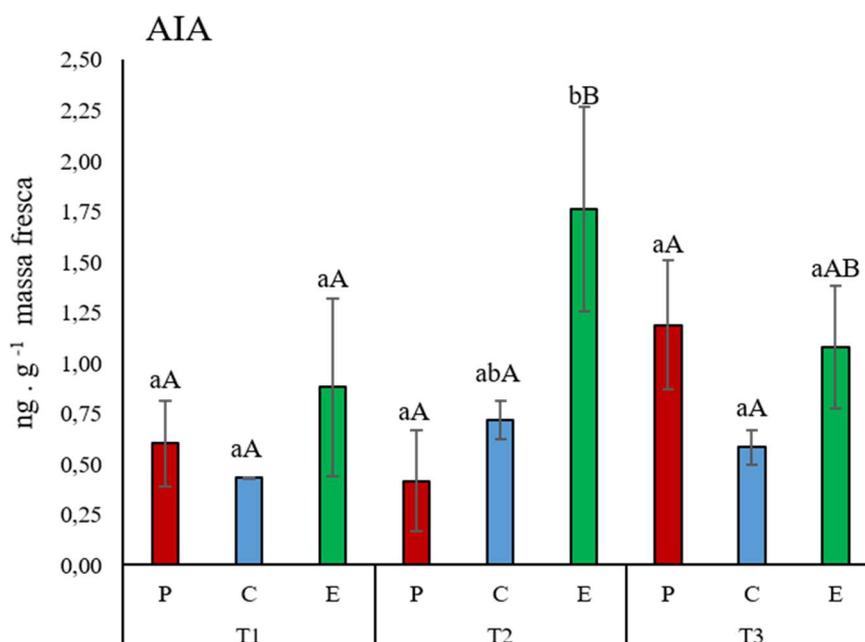


Figura 10. Gráfico de barras das concentrações (ng.g⁻¹ massa fresca) de AIA determinadas nas regiões do porta-enxerto (P), corte de enxertia (C) e enxerto (E) das mudas nos diferentes tratamentos. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre regiões (P, C e E) e letra maiúscula entre tratamentos (data de coleta) pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Os níveis de Z, em combinação com AIA, também podem explicar a maior taxa de soldadura que foi observada em T3 (85%, Figura 6). Os valores de ambos hormônios neste tratamento se apresentaram de modo mais equilibrado entre si e distribuídos de maneira semelhante entre as três porções da muda, em comparação aos demais tratamentos. Segundo MELNYK (2017), NANDA & MELNYK (2018) e TEDESCO et al. (2022), as auxinas e as citocininas são os hormônios-chave nas etapas de calogênese e vascularização, atuando, portanto, diretamente para o sucesso da enxertia.

De modo geral, o fato dos hormônios Z, tZ-R, AIA e AS terem sido encontrados em maiores concentrações nos tratamentos com as coletas mais tardias das estacas (T2 e T3), reforça o benefício desses tratamentos para a fisiologia da muda. Contudo, devido a estratégia experimental deste trabalho ter um confundimento de fatores entre os tratamentos, envolvendo variações no nível de ativação natural da dormência de gemas, no tempo de conexão com planta matriz durante a ativação da dormência e no tempo de exposição ao frio natural ou artificial, não é possível afirmar que o simples atraso ou a maior exposição ao frio de campo se destacam como a melhor alternativa para qualidade da muda. O que pode ser colocado com maior certeza,

com base nos resultados obtidos, é que a coleta antecipada (T1) foi mais prejudicial, devido à falta de aclimação dos tecidos para receber o frio artificial. Além disso, apesar do frio a campo ter favorecido alguns parâmetros de qualidade fitotécnica e o balanço hormonal da muda (T3, em comparação a T1 e T2), ainda não se atingiu a plena brotação e a plena soldadura de enxertia. Possivelmente, as mudas aclimatadas (coletas T2 e T3) se expostas a um período maior de frio artificial poderiam atingir ganhos nesses parâmetros. Este enfoque deve ser considerado em futuras ações experimentais ou comerciais para se elevar a proporção de mudas de videira com qualidade fisiológica superior.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo de extração, detecção e quantificação hormonal se mostrou efetivo na análise de tecidos lignificados da estaca de videira, sobretudo para os grupos hormonais ABA, GA₃, AJ, AS, Z, tZ-R e AIA.

A coleta antecipada de estacas, com pouca exposição prévia ao frio de campo, seguido de um prolongado tempo de armazenamento em frio artificial, foi prejudicial para as concentrações hormonais e para a qualidade das mudas.

As coletas mais tardias de estacas, após 157 HF e com 30 dias de câmara fria ou com 304 HF de campo, favoreceram os níveis hormonais e alguns parâmetros de qualidade. Contudo, essas condições não garantiram a produção plena de mudas com qualidade. Essas informações evidenciam a necessidade de mais experimentação nesta linha de pesquisa, considerando outras variações em data de coleta de estacas e tempos de armazenamento em câmara fria, para se obter um protocolo mais eficaz na produção de mudas de videira.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALMEIDA, F. J. Produção e certificação de mudas de plantas frutíferas. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.216, p.1-4, 2002.

ALVARENGA, A. A. et al. Origem e classificação botânica da videira. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 19, n. 194, p. 5-8, 1998.

ANZANELLO, R.; CHRISTO, M. C. Temperatura e tempo de frio para a superação da dormência de gemas de videiras ‘Chardonnay’, ‘Merlot’ e ‘Cabernet Sauvignon’. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 6, n. 3, p. 207-215, 10 nov. 2020.

ANZANELLO, R. et al. Bud dormancy in apple trees after thermal fluctuations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 457-464, 2014.

ANZANELLO, R.; FIALHO, F. B.; SANTOS, H. P. Chilling requirements and dormancy evolution in grapevine buds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, p. 364-371, 2018.

BHATLA, S. A. Plant growth regulators: an overview. In: BHATLA, S. A.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. Singapura: Springer, cap. 14, p.559-568, 2018.

_____. Recently discovered plant growth regulators. In: BHATLA, S. A.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. Singapura: Springer, cap. 22, p.681-728, 2018.

_____. Auxins. In: BHATLA, S. A.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. Singapura: Springer, cap. 15, p.569-601, 2018.

_____. Ethylene. In: BHATLA, S. A.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. Singapura: Springer, cap. 19, p.643-661, 2018.

_____. Brassinosteroids. In: BHATLA, S. A.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. Singapura: Springer, cap. 20, p.663-670, 2018.

_____. Jasmonic acid. In: BHATLA, S. A.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. Singapura: Springer, cap. 21, p.671-679, 2018.

BENATI, M. M. et al. Zoneamento das condições atuais e futuras de frio para o controle natural da endodormência em clones de Moscato Branco e cvs Vitis labrusca no sul do Brasil. In: **Embrapa Uva e Vinho-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., 2017. ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 11., 2017, Bento Gonçalves. Resumos... Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2017. p. 19., 2017.

BRASIL bate recorde de consumo de vinho na pandemia, aponta estudo. **Revista Globo Rural**, 13 de jul. de 2021. Economia. Disponível em: <<https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Economia/noticia/2021/07/brasil-bate-recorde-de-consumo-de-vinho-na-pandemia-aponta-estudo.html>>. Acesso em 02 de nov. de 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 5.153, de 23 julho de 2004. Aprova o Regulamento da Lei nº-10.711, de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas - SNSM, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jul. 2004. Seção 1, p.6.

COOKSON, S. J. et al. Graft union formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signalling, and secondary metabolism. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 10, p. 2997-3008, 2013.

COLLI, S.; PURGATTO, E. Etileno. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 13, p. 253-274, 2019.

DAVIES, Peter J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!**. Springer Science & Business Media, 2004.

DEGANI, A.L.G., CASS, Q. B., VIEIRA, P.C. Cromatografia: Um Breve Ensaio. Química Nova na Escola, n. 7, maio, 1998. Disponível em <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf>>. Acesso em 05 de jan. de 2022.

DU, F.; RUAN, G.; LIU, H. Analytical methods for tracing plant hormones. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 1, p. 55-74, 2012.

EICHHORN, K. W.; LORENZ, D. H. Phaenologische entwicklungsstadien der rebe. **Nachrichtenblatt des deutschen pflanzenschutzdienstes (Braunschweig)**, v. 29, p. 119-120, 1977.

EMBRAPA. **Mudas de qualidade superior**. 2013. Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/3839/mudas-de-qualidade-superior>>. Acesso em 12 de nov. de 2021.

EMBRAPA. **Agrometeorologia – Bento Gonçalves/RS**. 2019. Disponível em <<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/dados-meteorologicos/bento-goncalves>>. Acesso em 20 de fev. de 2022.

EMBRAPA. **A viticultura no Brasil**. Disponível em <<https://www.embrapa.br/cim-uva-e-vinho/a-viticultura-no-brasil>>. Acesso em 08 de nov. de 2021.

ESTÊVÃO, F. Algumas notas sobre os primórdios do vinho e da vinha no Mediterrâneo. **Trabalhos de Antropologia e Etnologia**, v. 56, 2016.

GARIGHAN, J. de A. **Quantificação de hormônios durante a dormência de gemas de macieira**. 2017. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biologia

Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2017.

GARRIDO, L. da R.; SÔNEGO, O. R. Manejo das doenças da videira em novas fronteiras agrícolas. In: **Embrapa Uva e Vinho-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 10., 2007, Fraiburgo. Anais... Caçador, Epagri, 2007. v. 1, p. 247-250., 2007.

GASPERINI, D. et al. Axial and Radial Oxylin Transport. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Vermont, v. 21, n. 6, p. 709-719, 2008.

GIOVANNINI, E. Origem e história da viticultura. In: _____. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Editora Renascença, 1999, p. 11-13.

_____. Propagação. In: _____. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Editora Renascença, 1999, p. 221-233.

GRAMAJE, D.; DIMARCO, S. Identifying practices likely to have impacts on grapevine trunk disease infections: a European nursery survey. **Phytopathologia Mediterranea**, v.54, n.2, p.313–324, 2015.

GROHS, D. S.; FELDBERG, N. P.; FAJARDO, T. V. M. Avanços na transferência de materiais propagativos de videira para viveiristas licenciados pela Embrapa. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 15., 2015, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015. p. 378.

GROHS, D. S.; et al. Advances in propagation of grapevine in the world. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, 2017.

GROHS, D. S. **Avanços no sistema de produção de mudas de videira pela enxertia de mesa na região sul do Brasil**. 2020. Tese (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020.

GUERRA, M. P.; RODRIGUES, M. A. Giberelinas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 11, p. 221-238, 2019.

HARARI, Y. N. **Sapiens: uma breve história da humanidade**. 51ed. Porto Alegre: L&PM, cap. 5, p. 87, 2020.

HARRISON, S. T. L. Cell disruption. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology**. Engineering Fundamentals of Biotechnology. 2ed. África do Sul: Elsevier, cap. 2, p.619-640, 2011.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588#resultado> > Acesso em 02 de nov. de 2021a.

IBGE. **Produção agrícola - lavoura permanente**. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/0?tipo=grafico&indicador=12067&localidade1=43> > Acesso em 02 de nov. de 2021b.

KALRA, G.; BHATLA, S. A. Cytokinins. In: BHATLA, S. A.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. Singapura: Springer, cap. 16, p.603-615, 2018.

_____. Gibberellins. In: BHATLA, S. A.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. Singapura: Springer, cap. 17, p.617-628, 2018.

_____. Abscisic acid. In: BHATLA, S. A.; LAL, M. A. **Plant physiology, development and metabolism**. Singapura: Springer, cap. 18, p.629-641, 2018.

KELLER, M. Taxonomy and anatomy. In: _____. **The science of grapevines**. 3ed. Burlington, MA, USA: Academic Press, cap. 1, p.1-60, 2020.

KERSTEN, E. Propagação vegetativa dos citros por métodos não convencionais. **Piracicaba: ESALQ**, v. 20, 1987.

KUHN, G. B.; REGLA, R. A.; MAZZAROLO, A. **Produção de mudas de videira (*Vitis* spp.) por enxertia de mesa**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 12p. Circular Técnica, 74, 2007.

KUSTER, M.; DE ALDA, M. L.; BARCELÓ, D. Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, n. 6, p. 900-916, 2006.

LAZZAROTTO, J.J.; TAFFAREL, J.C.; MONTEIRO, R. **Caracterização e Análise de Aspectos Sociais, Tecnológicos e Econômico-financeiros da Viticultura Gaúcha e Catarinense**. Documentos, 97, Embrapa Uva e Vinho, 1 ed., 49p. 2016.

LEÃO, P. C. S. Breve histórico da vitivinicultura e a sua evolução na região semiárida brasileira. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 81-85, 2013.

LEONEL, S.; RODRIGUES, J. D. Efeito da época de estaquia, fitorreguladores e ácido bórico no enraizamento de estacas de porta-enxertos de videira. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 27-32, 1993.

LJUNG, K.; SANDBERG, G.; MORITZ, T. Hormone analysis. In: DAVIES, P. J. (ed). **Plant hormones, biosynthesis, signal transduction, action!** 3ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. G, cap. 1, p. 671-694, 2004.

MARTINS, C. A. A filoxera na viticultura nacional. **Análise social**, v. 26, n. 112/113, p. 653-688, 1991.

MARTINS, R. Consumo de vinho no Brasil tem alta de 18% em 2020, puxado pelo e-commerce. **G1**, 20 de abr. de 2021. Economia. Disponível em:

<<https://g1.globo.com/economia/noticia/2021/04/20/consumo-de-vinho-tem-alta-de-18percent-em-2020-puxado-pelo-e-commerce.ghtml> >. Acesso em 02 de nov. de 2021.

MARTELLI G. P. Infectious diseases and certification of grapevines. In: MEDITERRANEAN NETWORK ON GRAPEVINE CLOSTEROVIRUSES 1992-1997 AND THE VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE A BIBLIOGRAPHIC REPORT, 1985-1997, Bari. **Proceedings...** Bari: CIHEAM, p.47-64, 1999.

MELNYK, C. W. Plant grafting: insights into tissue regeneration. **Regeneration**, v. 4, n. 1, p. 3-14, 2017.

MELO, N. F. Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO CODA DE NUTRIÇÃO VEGETAL, 1., 2002, Petrolina. Anais... Petrolina: CODA, 2002.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 9, p. 175-198, 2019.

MOREIRA, E. D. T. **Desenvolvimento e validação de metodologias SPE/HPLC para a determinação de estrógenos e fitoestrógenos em águas superficiais**. 2015. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Plant methods**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2011.

MULLINS, M. G.; BOUQUET, A.; WILLIAMS, L. E. **Biology of the grapevine**. Cambridge University Press, 1992.

NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A. Propagação vegetativa por enxertia. In: _____. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p.111-139.

NANDA, A. K.; MELNYK, C. W. The role of plant hormones during grafting. **Journal of plant research**, v. 131, n. 1, p. 49-58, 2018.

ORRANTIA-ARAUJO, M. A. et al. Changes in the endogenous content and gene expression of salicylic acid correlate with grapevine bud dormancy release. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 1, p. 254-262, 2020.

PASSAIA, G. Perfil transcricional comparativo de genes associados ao desenvolvimento do fruto das cultivares de uva Isabel e Isabel precoce (*Vitis labrusca* L.). 2009.

PEREIRA-NETTO, A. B. Brassinosteroides, jasmonatos, ácido salicílico e poliaminas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 14, p.275-285, 2019.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Citocininas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 10, p. 199-219, 2019.

PERUZZO, S. N. et al. Necessidade de horas de frio para superação da endodormência em cultivares *Vitis labrusca* L. In: **Embrapa Uva e Vinho-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 4., 2014, Bento Gonçalves, RS. Anais... Bento Gonçalves: IFRS, 2014., 2014.

PINA, A.; ERREA, P. A review of new advances in mechanism of graft compatibility–incompatibility. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n. 1, p. 1-11, 2005.

PU, C. et al. Modified QuEChERS method for 24 plant growth regulators in grapes using LC-MS/MS. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 2, p. 637-648, 2018.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2020.

REGINA, M. A. Produção e certificação de mudas de videira na França 2: técnica de produção de mudas pela enxertia de mesa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 590-596, 2002.

SAUNDERS, P. F.; HILLMAN, J. R. Isolation of plant growth substances. In: **Society of Experimental Biology, Seminar Series 4**. Cambridge University Press London, New York, Melbourne, 1978.

SHARMA, A.; ZHENG, B. Molecular responses during plant grafting and its regulation by auxins, cytokinins, and gibberellins. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 397, 2019.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SMART, D. R. et al. Dormant buds and adventitious root formation by *Vitis* and other woody plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 21, n. 4, p. 296-314, 2002.

SORIA, S. de J.; DAL CONTE, A. F. Bioecologia e controle das pragas da videira. **Embrapa Uva e Vinho-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2005.

SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1996.

SOUZA, L. M. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. 2008. Tese (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2008.

SOUZA, G. M. **Desenvolvimento e morfologia de inflorescências em videiras ‘Niagara Rosada’ (Vitis labrusca L.)**. 2013. Tese (Doutorado - Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2013.

SOUZA, D. F.; BORGES, E. M.; SOUZA, E. L. Desenvolvimento e validação de método multirresíduos para determinação de pesticidas em suco de uva utilizando QuEChERS por LC-MS/MS. In: **Anais eletrônicos do International Symposium on Science and Biotechnology**, p. 57-58, 2015.

STACCIARINI-SERAPHIN, E.; FRESCHI, L. Ácido abscísico. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, p. 239-252, 2019.

STEFFENS, B.; RASMUSSEN, A. The physiology of adventitious roots. **Plant physiology**, v. 170, n. 2, p. 603-617, 2016.

SZÉKÁCS, A. et al. Immunoassays for plant cytokinins as tools for the assessment of environmental stress and disease resistance. **Analytica chimica acta**, v. 421, n. 2, p. 135-146, 2000.

TAIZ, L. et al. Sinais e transdução de sinal. In: _____. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 14, p.407-445, 2017.

TARKOWSKÁ, D. et al. Quo vadis plant hormone analysis? **Planta**, v. 240, n. 1, p. 55-76, 2014.

TEDESCO, S. et al. Plant grafting and graft incompatibility: A review from the grapevine perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 299, p. 111019, 2022.

TERRAL, J. et al. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. **Annals of botany**, v. 105, n. 3, p. 443-455, 2010.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **TRENDS in Genetics**, v. 22, n. 9, p. 511-519, 2006.

VÖLKSCH, B.; BUBLITZ, F.; FRITSCH, W. Coronatine production by *Pseudomonas syringae* pathovars: screening method and capacity of product formation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 463-468, 1989.

ZANELLA, V. Programa de qualificação de viveiristas alavanca produção nacional de mudas de videira. **Embrapa**, 08 de ago. de 2017. Produção vegetal. Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/25768922/programa-de-qualificacao-de-viveiristas-alavanca-producao-nacional-de-mudas-de-videira>>. Acesso em 15 de nov. de 2021.