

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE ATIVIDADE DA
CATALASE, TAXA RESPIRATÓRIA E LIBERAÇÃO DA DORMÊNCIA
EM GEMAS DE VIDEIRA CULTIVADAS EM CLIMA TROPICAL

SAMYRA IMAD DA SILVA BOENO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO – 2014

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE ATIVIDADE DA
CATALASE, TAXA RESPIRATÓRIA E LIBERAÇÃO DA DORMÊNCIA
EM GEMAS DE VIDEIRA CULTIVADAS EM CLIMA TROPICAL

SAMYRA IMAD DA SILVA BOENO

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Ricardo Bressan-Smith.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 014/2015

Boeno, Samyra Imad da Silva

Influência da temperatura sobre atividade da catalase, taxa respiratória e liberação da dormência em gemas de videira cultivadas em clima tropical / Samyra Imad da Silva Boeno. – 2014.

41 f.

Orientador: Ricardo Bressan-Smith.

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Bibliografia: f. 37 – 41.

1. Liberação de dormência 2. Clima tropical 3. Catalasse 4. Videira 5. Gemas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 634.8

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE ATIVIDADE DA
CATALASE, TAXA RESPIRATÓRIA E LIBERAÇÃO DA
DORMÊNCIA EM GEMAS DE VIDEIRA CULTIVADAS EM CLIMA
TROPICAL

SAMYRA IMAD DA SILVA BOENO

Dissertação apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias
da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título
de Mestre em Produção Vegetal

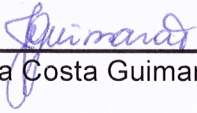
Aprovada em 26 de janeiro de 2014

Comissão Examinadora

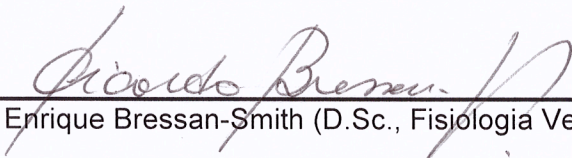
Prof^a. Sílvia Aparecida Martim (D.Sc., Fisiologia Vegetal) – UFRRJ



Dr. Leandro Hespagnol Viana (D.Sc., Fisiologia Vegetal) – UENF



Dr^a. Juliana Costa Guimarães (D.Sc., Fisiologia Vegetal) – UENF



Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith (D.Sc., Fisiologia Vegetal) – UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus;

A meu esposo Eliersio, pelo imenso apoio e incentivo;

A meus pais Leila e Merialdo e minha irmã Layle, pela motivação;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao programa de pós-graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Professor Ricardo Bressan por ter gentilmente me recebido em seu laboratório, pela orientação e confiança;

Aos Professores Eliemar Campostrini e Mara Menezes, pelos ensinamentos prestados;

A propriedade Tabuinha por conceder material vegetal para os experimentos;

À Dra. Juliana Guimarães e ao Dr. Tiago Ferraz pelos ensinamentos, pelo auxílio laboratorial e pela amizade;

Aos amigos de laboratório Alex, Amanda, Bárbara, Bruna, Débora, Fábio, Gleidson, Liane e Roberta pela amizade e pelo apoio;

A todos os amigos e familiares que fizeram parte desta conquista.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE	4
3. OBJETIVO GERAL	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1 Aspectos do crescimento e desenvolvimento em videiras	6
4.2 Dormência em gemas de videiras	7
4.3 Acúmulo de frio em gemas de videira	9
4.4 Atividade da catalase e níveis de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) durante a liberação da dormência em gemas de videira	10
4.5 Atividade respiratória	14
5. MATERIAL E MÉTODOS	16
5.1 Material vegetal e área experimental	16
5.2 Estratégias experimentais	16
5.2.1 Coleta do material para análises	17
5.2.2 Preparação das gemas antes de submetê-las aos tratamentos	17
5.2.3 Tratamento com cianamida hidrogenada (CH)	17
5.2.4 Tratamento com as temperaturas	18
5.3 Observação das brotações	19
5.4 Extração e atividade da catalase	21

5.5 Mensuração dos níveis de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	21
5.6 Avaliação da atividade respiratória no escuro (Rd) durante o período de quebra de dormência e brotação	22
5.7 Análise estatística	23
6. RESULTADOS.....	24
6.1 Experimento 1 – Inter-relação entre evolução da brotação, atividade da catalase, níveis de H ₂ O ₂ e respiração de gemas tratadas com aplicação de Cianamida Hidrogenada	24
6.2 Experimento 2 – Evolução da brotação, atividade da catalase e respiração de gemas tratadas com alta e baixa temperatura	27
7. DISCUSSÃO.....	31
8. CONCLUSÃO	36
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

BOENO, Samyra Imad, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, janeiro de 2014. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE ATIVIDADE DA CATALASE, TAXA RESPIRATÓRIA E LIBERAÇÃO DA DORMÊNCIA EM GEMAS DE VIDEIRA CULTIVADAS EM CLIMA TROPICAL. Orientador: Prof. Ricardo Bressan-Smith.

Quando videiras não são submetidas a períodos de baixas temperaturas, situação comum em regiões tropicais, a brotação pós-invernal de gemas parece ser comprometida. Um dos sinais bioquímicos indicativos na brotação é a diminuição da atividade da catalase, enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos tecidos da gema. Neste trabalho, avaliou-se se a diminuição da atividade da catalase e a variação dos eventos bioquímicos que normalmente ocorrem após dormência causada pelo frio, também ocorrem em plantas sujeitas a altas temperaturas. Foi observado que a videira em questão, quando exposta à baixa temperatura, parece necessitar de um tempo para que suas atividades metabólicas sejam restabelecidas, depois colocadas à temperatura alta. E ainda, os resultados consideram que videiras Niagara Rosada cultivadas em região tropical, não respondem de forma semelhante à CH e à baixa temperatura.

ABSTRACT

BOENO, Samyra Imad, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, janeiro de 2014. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE ATIVIDADE DA CATALASE, TAXA RESPIRATÓRIA E LIBERAÇÃO DA DORMÊNCIA EM GEMAS DE VIDEIRA CULTIVADAS EM CLIMA TROPICAL. Orientador: Prof. Ricardo Bressan-Smith.

In the tropics, the lack of a significant period of low temperatures promotes erratic bud break in grapevine (*Vitis* spp). One of biochemical evidences that appears to trigger bud break is the inhibition of the catalase activity, an enzyme associated to the decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the bud tissues. In this study, we evaluated if the catalase activity reduction and the variation of biochemical events that usually occur in dormant-induced buds, also occur in grapevines grown in high temperatures, with apparently non-dormant buds. The results showed a similar profile of biochemical events in the referred vines. We also tried to prove if cold-shock ($8^{\circ}C$) could be useful to accelerate the bud break. This treatment postponed the bud break, probably caused by a general reduction of the metabolic rates but when turning back to the the optical growing conditions ($27^{\circ}C$), a period of time is necessary to its recovery.

1. INTRODUÇÃO

A videira é tradicionalmente cultivada em regiões de clima temperado por causa da necessidade de fotoperíodos curtos e baixas temperaturas para entrar em repouso vegetativo (Nir et al., 1986; Dokoozlian, 1999; Wake e Fennel, 2000; El-Shereif et al., 2005; Pérez e Lira, 2005; Pérez et al., 2007; Martínez et al., 2009; Mathiason et al., 2009; Or, 2009; Mohamed et al., 2010; Keller e Tarara, 2010; Vergana e Pérez, 2010; Grant et al., 2013). No período de frio, portanto, as gemas entram em estado de dormência para se protegerem contra as condições desfavoráveis (Mohamed et al., 2012) e, após a retomada das condições ótimas de temperatura e do fotoperíodo, a dormência é naturalmente quebrada. Com o surgimento de novas brotações, são formados novos ramos, vegetativos e reprodutivos.

A indução e liberação da dormência são genética e ambientalmente controladas, sendo o fotoperíodo e a temperatura os principais fatores da indução desses processos (Dokoozlian, 1999; Wake e Fennel, 2000; El-Shereif *et al.*, 2005; Pérez e Lira, 2005; Pérez *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2009; Mathiason *et al.*, 2009; Or, 2009; Mohamed *et al.*, 2010; Keller e Tarara, 2010; Vergana e Pérez, 2010; Grant *et al.*, 2013). Assim que as condições ambientais se tornam favoráveis, depois de um período invernal, ocorre uma série de eventos nas gemas associados à quebra da dormência, como, por exemplo, a diminuição da atividade da catalase (Nir et al., 1986; Pérez e Lira, 2005) e o aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio (Pérez e Lira, 2005).

A atividade reduzida da catalase, enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gera um aumento dos níveis celulares deste composto, levando ao estresse oxidativo e a um distúrbio respiratório transitório, para então as gemas serem liberadas da dormência (Pérez et al., 2008).

Neste contexto, apesar do grande potencial das regiões de clima tropical para cultivo da videira, a falta de períodos de frio pleno resulta em dormência prolongada ou brotações atrasadas, o que leva à ineficiência do processo de quebra de dormência (Dokoozlian, 1999; Or, 2009). Portanto, sabendo que o repouso causado pela baixa temperatura induz à dormência das gemas, e que, nestas condições, a quebra da dormência gera brotações mais uniformes (Pérez e Lira, 2005), climas quentes sem períodos frios podem parecer inadequados ao cultivo da videira. Para amenizar a desuniformidade das brotações, ou seja, para superar a ausência do repouso hibernar, as plantas são submetidas à deficiência hídrica seguida do uso de indutores de brotação, dos quais o mais comumente utilizado é a cianamida hidrogenada (Nir *et al.*, 1986; Or *et al.*, 2000; Or *et al.*, 2002; Pérez e Lira., 2005; Keilin *et al.*, 2007; Pang *et al.*, 2007; Halaly *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2009; Vergana e Pérez, 2010 e Mohamed *et al.*, 2012).

A aplicação da cianamida hidrogenada leva a uma série de eventos bioquímicos que se assemelham àqueles observados em gemas cultivadas em regiões temperadas. Este indutor acelera e uniformiza o processo de brotação em gemas dormentes e sua ação está relacionada com a diminuição da atividade da catalase (Nir *et al.*, 1886; Pérez e Lira, 2005; Pérez *et al.*, 2008; Mohamed *et al.*, 2012), o aumento dos níveis de H_2O_2 (Pérez e Lira, 2005; Pérez *et al.*, 2008) e as variações na atividade respiratória (Pérez *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2009). Além destes eventos, Or *et al.* (2002), Halaly *et al.* (2008) e Mohamed *et al.* (2012) observaram redução dos níveis de transcritos da catalase em gemas de videira tratadas com cianamida hidrogenada.

Basicamente, as informações disponíveis sobre a brotação de gemas em videiras foram obtidas de videiras crescendo em climas temperados. A ausência de dados experimentais sobre a brotação de gemas em plantas sob altas temperaturas (climas tropicais) é evidente. A importância desse estudo está em melhor entender os eventos bioquímicos que controlam a indução do processo de brotação da videira desenvolvida em clima tropical e, ainda, entender se o pré-

tratamento com baixa temperatura é capaz de induzir a brotação das gemas de forma semelhante à cianamida hidrogenada.

2. HIPÓTESE

A diminuição da atividade da catalase, que antecede a quebra de dormência das gemas, desencadearia outros eventos, tais como o aumento dos níveis de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) nas gemas. Esse aumento dos níveis do H_2O_2 causaria um estresse oxidativo e distúrbio respiratório nas células, e então as gemas seriam liberadas da dormência. Diante destes eventos, o submetimento à baixa temperatura e a aplicação de cianamida hidrogenada (CH) parecem provocar efeitos similares nas gemas. Efeitos estes citados anteriormente, tais como a diminuição da atividade da catalase, entre outros eventos bioquímicos que culminariam em brotações mais satisfatórias. Neste contexto, a análise de gemas tratadas com aplicação de CH, com baixa e alta temperatura, apontaria a influência desses dois tratamentos na liberação da dormência de gemas de videira Niagara Rosada.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da baixa temperatura e cianamida hidrogenada na liberação da dormência, através da atividade da catalase, níveis de peróxido de hidrogênio e taxa respiratória em gemas de videira cultivadas em clima tropical.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Aspectos do crescimento e desenvolvimento em videiras

A videira é uma planta do tipo lenhosa, perene e sarmentosa.

As gemas da videira são denominadas complexas, pois existem dois tipos: gema lateral e gema latente ou composta (Srinivasan e Mullins, 1981). A gema lateral é formada na axila da folha, enquanto a gema composta é formada junto à gema lateral e é constituída por três gemas em seu interior (Srinivasan e Mullins, 1981; Souza, 2013). Junto à primeira gema latente formada, chamada “gema latente primária”, surgem as gemas latentes secundária e terciária (Srinivasan e Mullins, 1981; Souza, 2013).

O desenvolvimento da videira ocorre através de ciclos vegetativos separados por períodos de repouso (Pedro Júnior et al., 1993). Segundo estes autores, o ciclo vegetativo é subdividido por períodos de:

- Crescimento: Da brotação à paralisação do crescimento;
- Reprodutivo: Da floração ao amadurecimento dos frutos;
- Amadurecimento dos tecidos: Da paralisação do crescimento à lignificação.

Em regiões com invernos menos rigorosos, a planta não apresenta repouso hibernar (Pires, 1998; Silva et al., 2008), sendo possível a realização de podas de produção em qualquer época do ano. Porém, nestas regiões, torna-se

importante induzir as plantas ao descanso após a colheita, devido à ausência do repouso hibernar (Murakami, 2002). Esse descanso consiste na suspensão da irrigação para submeter a planta à uma deficiência hídrica (Leão e Maia, 1998). Passado o descanso de 30 a 60 dias, se inicia então, um novo ciclo fenológico condicionado aos fatores climáticos do período.

Neste contexto, os principais fatores climáticos que interferem nas fases fenológicas da videira são: luminosidade, temperatura, precipitação, velocidade do vento e umidade relativa (Sentelhas, 1998). Deste modo, esses fatores climáticos apresentam grande importância na duração do ciclo e na qualidade dos frutos.

4.2 Dormência em gemas de videiras

Dormência é um processo fisiológico natural de repouso de plantas, para se proteger contra as condições desfavoráveis do meio ao seu crescimento. Anteriormente à dormência, há uma alteração no balanço hormonal da planta, resultando em uma drástica diminuição da atividade metabólica (Lavee, 1973) e então, o desenvolvimento vegetativo é temporariamente suspenso com o início da dormência. Devido a invernos rigorosos, as fruteiras de clima temperado, como a videira, entram em repouso como um mecanismo de defesa para resistir às condições adversas (Petri et al., 1996).

Em climas temperados, as fruteiras, tais como a videira, crescem e se desenvolvem durante a primavera e o verão devido a condições favoráveis de luz, umidade, temperatura e fotoperíodo. À medida que se aproxima o outono, o fotoperíodo e a temperatura vão se tornando cada vez mais desfavoráveis a seu desenvolvimento, e a chegada do inverno com frio intenso, promove a queda das folhas e entrada em dormência (Pérez e Lira, 2005). Com a chegada da primavera, ocorre a liberação ou quebra da dormência, com a retomada do metabolismo normal da planta, então se inicia um novo ciclo vegetativo com brotações uniformes e satisfatórias (Pérez e Lira, 2005).

A quebra da dormência em regiões temperadas está relacionada com a diminuição da atividade da catalase, conforme relatado pelos autores Nir et al

(1986) e Pérez e Lira (2005). A diminuição da atividade da enzima em questão gera o aumento dos níveis de H_2O_2 nos tecidos, causando um estresse oxidativo e distúrbio respiratório, para então as gemas serem liberadas da dormência (Pérez et al., 2008).

Lang (1987) classificou os estados da dormência de gemas em: paradormência, endodormência e ecodormência. Na paradormência o crescimento é regulado pelo aumento de reguladores de crescimento originados fora da gema. Durante a endodormência, o crescimento é reprimido por fatores endógenos e o requerimento de frio precisa ser satisfeito para o crescimento ser reassumido. Já na ecodormência, a quebra da dormência está limitada por fatores ambientais e geralmente ocorre entre o fim do inverno e o início da primavera.

Em regiões de clima tropical, onde o inverno é caracterizado pela falta de frio intenso, ocorre sintomas de dormência prolongada, incluindo brotações atrasadas e em baixa porcentagem (Dokoozlian, 1999; Or, 2009). Portanto, em regiões como esta, se torna necessário, após a poda, aplicação de substância química indutora de brotação, evitando que esta ocorra de forma deficiente e desuniforme (Vergana e Pérez, 2010). O indutor de brotação mais comumente utilizado é a cianamida hidrogenada (Vergana e Pérez, 2010).

A aplicação da cianamida hidrogenada leva a uma série de eventos bioquímicos que se assemelham àqueles observados em gemas cultivadas em regiões temperadas. Este indutor acelera e uniformiza o processo de brotação em gemas dormentes e sua ação está relacionada com a diminuição da atividade da catalase (Nir et al., 1986; Pérez e Lira, 2005; Pérez et al., 2008; Mohamed et al., 2012), o aumento dos níveis de H_2O_2 (Pérez e Lira, 2005; Pérez et al., 2008) e as variações na atividade respiratória (Pérez et al., 2008; Pérez et al., 2009). Em concordância, Or et al (2002), Halaly et al (2008) e Mohamed et al. (2012) observaram redução nos níveis de transcritos da catalase após aplicação da CH em gemas de videira.

Em estudos realizados por Pérez e Lira (2005), comparando a quebra de dormência de gemas em região de invernos menos vigorosos, com e sem uso de CH, observaram que as gemas tratadas com aplicação de CH, tiveram 50% de quebra de dormência oito semanas depois da data da aplicação, enquanto as gemas do grupo controle (sem aplicação de CH) permaneceram dormentes. Enquanto nos resultados de Martínez et al (2009), gemas tratadas com CH

alcançaram 50% de quebra de dormência 23 dias após a aplicação, as gemas controle atingiram 7% de liberação da dormência para o mesmo período.

4.3 Acúmulo de frio em gemas de videira

Após período de frio, quando as condições ambientais se tornam favoráveis ao desenvolvimento, o início e a uniformidade das brotações são determinados pelo tempo e pela intensidade que essas plantas foram expostas às baixas temperaturas. Isto está relacionado com a diminuição da atividade da catalase causada pelo frio, conforme relatado pelos autores Nir et al (1986) e Pérez e Lira (2005). Em relação à intensidade que a planta é exposta ao frio, temperaturas entre 0 e 10°C têm similar efeito para a quebra da dormência (Dokoozlian, 1999). Porém, quanto ao tempo que a planta é submetida à baixa temperatura, a quantidade de horas influencia na rapidez e uniformidade da taxa de quebra de dormência (Dokoozlian, 1999).

Tradicionalmente, acumulação de unidades de frio (do inglês: chilling units - CU) tem sido usado como indicador para estimar datas de quebra de dormência, e determinar a necessidade de aplicação de substância química indutora de brotação (Martínez et al., 2009). Assim, uma unidade de frio corresponde a uma hora de exposição à baixa temperatura.

O percentual da quebra de dormência aumenta gradualmente com a quantidade de horas de frio aplicado (CU). Dokoozlian (1999) observou em seus estudos que uma breve exposição (50 horas) das videiras 'Perlette' à temperatura entre 0 e 10°C, aumentou significativamente a taxa de quebra de dormência, comparado às uvas que não foram submetidas à temperatura baixa. Para esta cultivar, exposição por 200 h entre 0 e 10°C resultou em níveis de quebra de dormência comercialmente aceitáveis, embora as taxas tenham subido à medida que as horas de exposição aumentaram até 800 horas.

A quantidade de horas de frio ideal exigida pela planta durante a dormência varia entre as diferentes cultivares de uva. Mohamed et al. (2010) reportaram que 400 h a 5°C induziu mais de 50% da quebra de dormência em cv. Superior Seedless. Em 'Vitis riparia' há maior necessidade de acumulação de

horas de frio para que sua exigência de frio seja satisfeita. Mathiason et al. (2009) indicam que 1.500 horas de frio são suficientes para potencial quebra de dormência em 'Vitis riparia', porém 2.000 horas aumentaram significativamente a taxa de liberação da dormência.

Entretanto, em locais de invernos menos rigorosos, onde a baixa temperatura é insuficiente para atingir as exigências de frio da videira, a quebra de dormência pode ser deficiente ou desuniforme (Vergana e Pérez, 2010). Esta condição gera efeitos adversos, tais como: baixa uniformidade e desenvolvimento dos ramos, atraso na brotação das gemas e baixa produtividade (Or et al., 2002).

4.4 Atividade da catalase e níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante a liberação da dormência em gemas de videira

Catalase é a enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Conforme ilustrado através da Figura 1, a catalase é uma enzima tetraédrica que contém um grupo prostético heme em cada uma de suas subunidades (Pérez e Lira, 2005). É extremamente eficiente, podendo decompor milhões de moléculas a cada segundo (Chelikani et al., 2004). Essa enzima usa o íon ferro, preso no centro de cada grupo heme, para ajudar nas rápidas reações (Chelikani et al., 2004).

O peróxido de hidrogênio é uma espécie de oxigênio reativo, rapidamente degradado pela catalase. Quando acumulados nos tecidos provocam estresse oxidativo, que é o desequilíbrio entre o acúmulo de espécie de oxigênio reativo e sua desintoxicação através dos agentes antioxidantes.

A decomposição do H_2O_2 ocorre em duas etapas, conforme relatado por Chelikani et al., (2004) e representado através da Equação abaixo (Equação 1). Primeiramente, quando o H_2O_2 entra no sítio ativo da catalase, ela interage com aminoácidos e é quebrada. O átomo de oxigênio se liga ao ferro do grupo heme e uma molécula de água (H_2O) é liberada. Em seguida, uma segunda molécula de H_2O_2 é quebrada, então a nova molécula de oxigênio irá se ligar à outra anteriormente ligada ao ferro. Logo, gás oxigênio (O_2) e água (H_2O) são liberados.

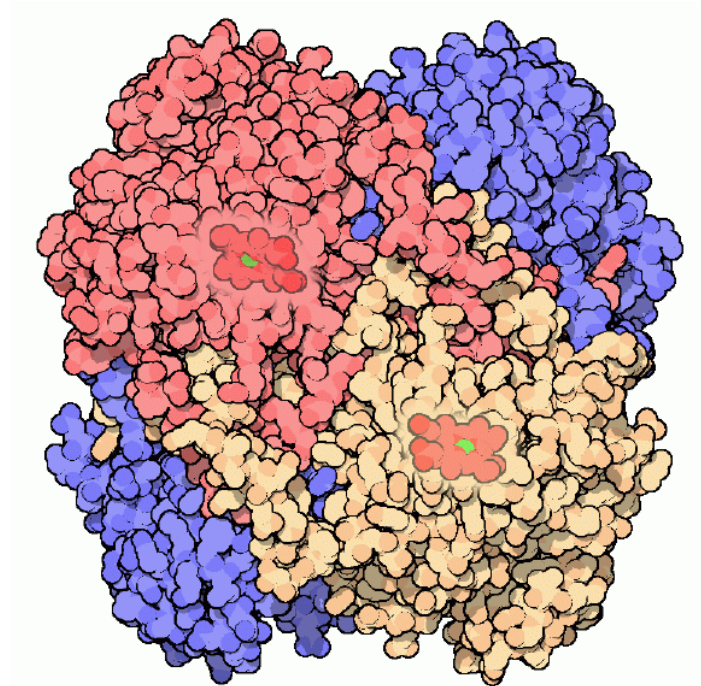
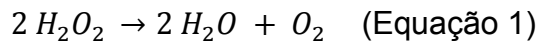


Figura 1. Estrutura enzimática da catalase (Chelikani *et al.*, 2004).

Assim, quando a atividade da catalase é diminuída nos tecidos da gema da videira anteriormente à liberação da dormência, ocorrerá um acúmulo dos níveis de H_2O_2 (Pérez *et al.*, 2008). Esse acúmulo leva a um estresse oxidativo momentâneo e distúrbio respiratório transitório nas células, e então a gema é liberada da dormência (Pérez *et al.*, 2008). Nir *et al.* (1986) demonstram com clareza em seus estudos, a diminuição da atividade da catalase e o concomitante aumento da quebra de dormência em gemas, comprovando a correlação existente entre os dois acontecimentos.

A catalase parece atingir menores atividades quando submetidas ao frio em relação a quando são expostas às altas temperaturas. Resultados mostrados por Nir *et al.* (1986), revelam as maiores atividades da catalase quando as gemas

são tratadas às altas temperaturas, e atividades menores para gemas submetidas à temperatura baixa (Figura 2).

Nir et al (1986) ainda compararam a atividade da catalase em gemas de videiras cultivadas em duas regiões distintas, sendo uma caracterizada por outono quente e inverno com muitos dias claros e relativamente altas temperaturas, e a outra de clima subtropical. Esses autores constataram que a diminuição da atividade da catalase, ocorrida no final do inverno, na região de clima subtropical foi mais rápida comparada à região de clima quente. A diferença na velocidade da diminuição da atividade enzimática nessas regiões com diferentes climas, explicaria o lento efeito causado pelas altas temperaturas durante o inverno para a quebra de dormência.

Entretanto, com a aplicação de indutor de brotação nas gemas de videira cultivadas em regiões com invernos menos rigorosos, a atividade da catalase diminui de forma semelhante ao que ocorre em regiões temperadas. Pérez e Lira (2005) comparando região de inverno quente (com uso de CH) e temperado observaram semelhante redução na atividade da catalase. Em concordância, Nir et al (1986) observaram que a baixa temperatura e a CH reduziram 45 e 50% a atividade da catalase, respectivamente.

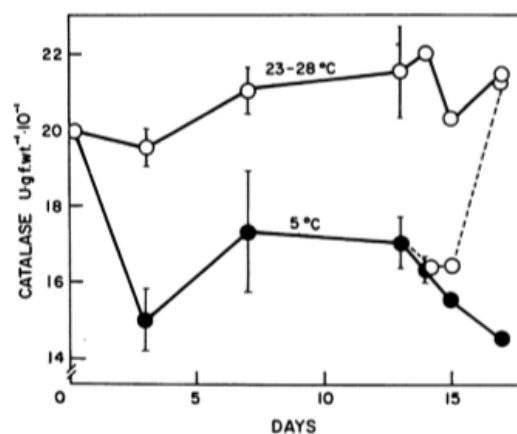


Figura 2. Efeito da baixa e alta temperatura na atividade da catalase (Nir et al., 1986).

A liberação da dormência de gemas, conforme já descrito anteriormente, parece estar associada à diminuição da atividade da catalase e com isso, ao aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o que provoca estresse oxidativo momentâneo nos tecidos (Pérez *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo temporário é parte do mecanismo que leva a quebra da dormência em gemas de uva (Halaly *et al.*, 2008). Segundo Pérez e Lira (2005), o pico de H_2O_2 precedente à liberação da dormência, agiria como um sinalizador para a expressão de genes relacionados com a liberação da mesma.

Ao induzir a liberação da dormência em gemas de videira, Halaly *et al.* (2008), Pérez *et al.* (2009) e Mohamed *et al.* (2012) reportaram um aumento nos níveis de transcritos de agentes do sistema de defesa antioxidante. Isto ocorre porque o estresse oxidativo, causado pelo acúmulo de H_2O_2 , ativa os mecanismos de defesa antioxidante. Portanto, a indução desses genes comprova o desenvolvimento de estresse oxidativo dentro da gema durante a indução da liberação da dormência. Entre os genes reportados estão a glutathione redutase/GR (Halaly *et al.*, 2008 e Pérez *et al.*, 2009), ascorbato peroxidase/APX (Halaly *et al.*, 2008 e Mohamed *et al.*, 2012), glutathione S transferase/GST, tioredoxina h/TrH, estilbeno sintase/StSy (Halaly *et al.*, 2008), glicose-6-fosfato-desidrogenase/G6PD (Pérez *et al.*, 2009) e peroxidase/POD (Nir *et al.*, 1986 e Mohamed *et al.*, 2012).

Em relação ao nível de H_2O_2 em gemas de videiras cultivadas em região tropical, altas temperaturas durante o inverno parecem causar quebra de dormência irregular devido à alteração no metabolismo oxidativo de gemas (Pérez *et al.*, 2007). Neste contexto, Pérez *et al.* (2007) relacionam essa irregular quebra de dormência em regiões de invernos menos rigorosos, com o aumento do nível de H_2O_2 observado durante a dormência de gemas. Enquanto o nível de H_2O_2 aumentou durante a dormência de gemas cultivadas em região com invernos menos rigorosos, o oposto foi observado durante o mesmo período em região temperada.

4.5 Atividade respiratória

Enquanto dormentes, as taxas metabólicas das gemas estão extremamente reduzidas, incluindo a taxa respiratória (Martínez *et al.*, 2009). Quando ocorre a sinalização para a saída da dormência, vários trabalhos (Or *et al.*, 2000; Halaly *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2008 e Pérez *et al.*, 2009) apontam para a ocorrência de um distúrbio respiratório momentâneo. O distúrbio respiratório faz parte do mecanismo que leva a quebra da dormência em gemas de videira (Halaly *et al.*, 2008).

Pérez *et al.* (2008) apontam o distúrbio respiratório como um aumento da taxa respiratória. Em seus resultados, esses autores observaram um crescente aumento da liberação de gás carbônico (CO₂) após aplicação do indutor de brotação nas gemas, sendo este aumento o dobro em relação às gemas controle com vinte e quatro horas após iniciado o tratamento. Em concordância, Martínez *et al.* (2009) observaram um aumento de 3.7 para 346 nmolesCO₂s-1mg-1 na transição da fase de dormência para o início da brotação.

Em estudo mais recente, Pérez *et al.* (2009) observaram a inibição da captação de oxigênio (O₂) pelo mesmo indutor de brotação usado anteriormente. Or *et al.* (2000) e Halaly *et al.* (2008) observaram após aplicação de indutor de brotação, aumento no nível de transcritos das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e piruvato descarboxilase (PDC). Essas enzimas estão envolvidas com respiração anaeróbia através do metabolismo fermentativo. Logo, esses autores apontam a falta de O₂ como sendo o distúrbio respiratório que ocorre na gema induzida a brotar.

Apesar dos eventos relacionados ao distúrbio respiratório não estarem em total concordância, já que alguns trabalhos relatam o aumento da liberação de CO₂ e outros, inibição da captação de O₂ após indução da brotação, é notável que os acontecimentos que compreendem a respiração da gema, são alterados anteriormente à liberação da dormência.

Em relação à irregular quebra de dormência observada em regiões tropicais, Pérez *et al.* (2007) relacionam esse acontecimento com o aumento da capacidade respiratória mitocondrial observada durante a dormência de gemas. Enquanto a capacidade respiratória mitocondrial aumentou durante a dormência

de gemas cultivadas em região com invernos menos rigorosos, o oposto foi observado durante o mesmo período em região temperada.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material vegetal e área experimental

Foram utilizadas gemas de videiras coletadas no vinhedo da propriedade rural Tabuinha, no 3º distrito do município de São Fidélis, RJ. A área experimental localiza-se na latitude de 21°31'01" S e longitude de 41°42'56.9" W.

As gemas foram coletadas da videira cv. Niagara Rosada *Vitis labrusca* enxertadas sob o porta-enxerto IAC 766. As plantas foram conduzidas no sistema do tipo latada, cultivadas a céu aberto, espaçadas a 2,7 m entre linhas e 2 m entre plantas e a irrigação realizada por meio de um gotejador por planta, próximo ao caule.

5.2 Estratégias experimentais

Este projeto teve como foco analisar o efeito da cianamida hidrogenada (CH) e a baixa temperatura na liberação da dormência de gemas de videira Niagara Rosada.

5.2.1 Coleta do material para análises

Os ramos de videira, contendo aproximadamente cinco gemas cada, foram coletados durante a poda, na propriedade rural Tabuinha e levados ao laboratório de Fisiologia Vegetal na UENF, onde foram imediatamente imersos em água.

O material utilizado foi coletado em períodos diferentes para o tratamento com CH, em relação aos tratamentos com as temperaturas. Isso ocorreu porque, devido ao curto período de tempo disponível para realização dos experimentos, inicialmente seria realizado apenas os tratamentos com as temperaturas. A decisão da inclusão de mais um tratamento com a intenção de complementação do trabalho, ocorreu posteriormente.

Neste contexto, os ramos para os tratamentos com as temperaturas foram coletados no início de março, recebendo, portanto, as altas temperaturas do verão no período anterior à poda. Neste período foram observadas temperaturas próximas ou até superiores a 40°C com frequência.

Enquanto o material para o tratamento com uso de CH foi coletado no final de julho, recebendo temperaturas mais amenas do outono no período anterior à poda. Neste período, as temperaturas observadas durante o dia, foram em média, pouco menos de 30°C.

5.2.2 Preparação das gemas antes de submetê-las aos tratamentos

Os ramos de videira com aproximadamente cinco gemas cada, coletados e levados ao laboratório, foram cortados em fragmentos de ramos contendo uma gema. Os fragmentos de ramos foram colocados em bandejas plásticas preenchidas com água, e sustentados por uma placa de isopor, conforme ilustrado através da Figura 3.

5.2.3 Tratamento com cianamida hidrogenada (CH)

Com os fragmentos de ramos devidamente acomodados nas bandejas plásticas, a CH (Dormex® - 5%) foi aplicada nas gemas com o auxílio de um pincel. As bandejas foram mantidas no laboratório à temperatura de 27°C e

fotoperíodo de treze horas. Conforme apresentado através da Figura 3A, medições da taxa respiratória, atividade da catalase e níveis de H_2O_2 foram realizados no 6º, 8º, 9º, 10º e 11º dias após iniciado o tratamento, de acordo com metodologia modificada de Pérez et al. (2008).

Quarenta e oito desses fragmentos de ramos foram separados em uma bandeja. Essas gemas então foram observadas individualmente a cada dois dias, para visualização do intumescimento das mesmas, que é a parte visível da quebra da dormência, quando a ponta da gema fica esverdeada (Figura 3A). As gemas intumescidas eram acompanhadas e a quantidade de gemas brotadas no decorrer dos dias, até que 50% delas tivessem liberação da dormência, eram observadas. Ou seja, o acompanhamento das brotações ocorreu até que o índice denominado BR50 fosse atingido.

5.2.4 Tratamentos com as temperaturas

Com o intuito de investigar o efeito da baixa temperatura na liberação da dormência, os fragmentos de ramos foram submetidos a dois tratamentos. Conforme ilustrado nas Figuras 3B e 3C, respectivamente, um grupo de gemas foi submetido a tratamento com temperatura ambiente (27°C) e outro grupo a um pré-tratamento de 16 dias com baixa temperatura (8°C) anteriormente ao tratamento com temperatura ambiente.

Os dois grupos foram acomodados em BOD com temperaturas especificadas abaixo e fotoperíodo de treze horas. O grupo tratado com temperatura ambiente foi mantido em BOD a 27°C por 16 dias, conforme metodologia ajustada de Nir et al. (1986). Medições da taxa respiratória e atividade da catalase foram mensuradas no 4º, 8º e 12º dias após iniciado o tratamento. Enquanto o grupo pré-tratado com baixa temperatura anteriormente ao tratamento com temperatura ambiente, foi mantido em BOD a 8°C por 16 dias. Após esse período, as gemas foram colocadas em BOD à temperatura ambiente (27°C) por mais 4 dias, com base na metodologia alterada de Nir et al. (1986). Medições da taxa respiratória e atividade da catalase foram mensuradas no 4º, 8º, 12º, 17º, 18º, 19º e 20º dias após iniciado o pré-tratamento.

Grupos de estacas retiradas dos dois tratamentos com as temperaturas foram tratados com CH (Dormex® - 5%) antes de iniciado os tratamentos. Então,

com as gemas tratadas a 27°C e aplicação de CH, foi mensurada a taxa respiratória no 4º, 8º, e 12º dias após início do tratamento. Já com as gemas pré-tratadas a 8°C e aplicação de CH, foi mensurada a taxa respiratória no 4º, 8º, 12º, 17º, 18º, 19º e 20º dias após iniciado o pré-tratamento.

Quarenta e oito dos fragmentos de ramos sem CH aplicada, mais quarenta e oito submetidas à CH do tratamento com temperatura ambiente foram separados em uma bandeja (Figura 3B). Essas gemas foram observadas individualmente a cada dois dias para visualização do intumescimento das mesmas, e assim como já descrito anteriormente, a quantidade de gemas brotadas no decorrer dos dias foi acompanhada, até que o índice denominado BR50 fosse atingido.

Da mesma forma e com a mesma finalidade descrita acima, também houve a separação das mesmas quantidades de gemas para o grupo pré-tratado com baixa temperatura (Figura 3C).

5.3 Observação das brotações

A cada 2 dias foi feita a contagem das gemas que iniciaram brotação, que é a parte visível da quebra da dormência, quando a ponta da gema fica esverdeada. A contagem foi realizada até que 50% das gemas tivessem sua dormência quebrada, ou seja, até que atingissem o índice denominado BR50 (Koussa et al., 1994).

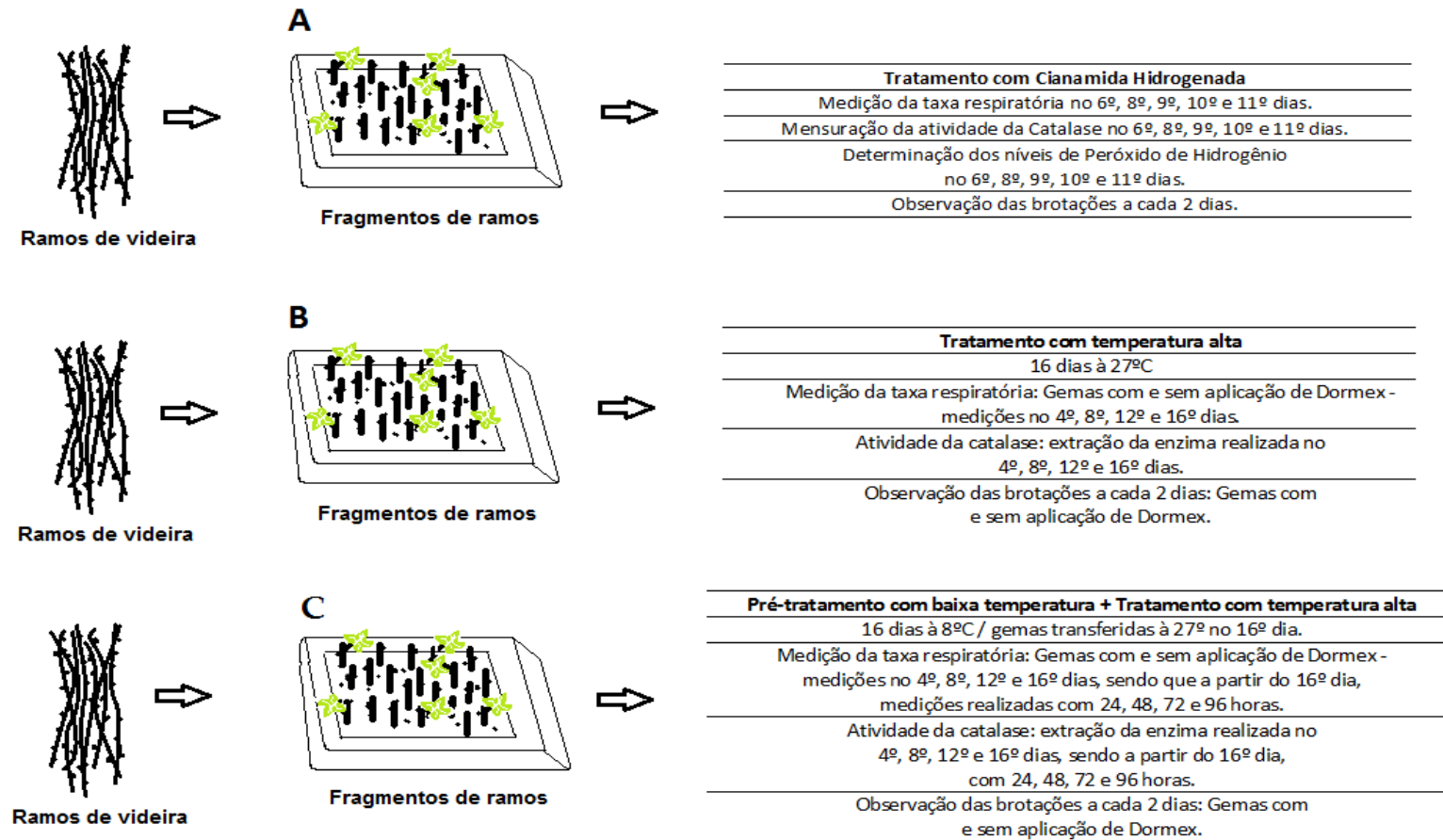


Figura 3. Ramos de videira cortados em fragmentos de ramos para posterior (A) Tratamento com cianamida hidrogenada, (B) Tratamento com temperatura alta e (C) Pré-tratamento com baixa temperatura anteriormente ao tratamento com temperatura alta.

5.4 Extração e atividade da catalase

Primeiramente foi preparado um tampão de extração seguindo método modificado de Pérez *et al* (2008), contendo tampão fosfato de potássio (pH 7.5), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Ácido Ascórbico, Triton X-100 e ditioneitol (DTT). Em seguida, as gemas foram maceradas, na presença de 2% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVPP), até atingirem consistência fina com nitrogênio líquido. Então, em cada 0,05 g de macerado usado, foi adicionado 1 ml do tampão de extração. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e congelado em nitrogênio líquido, para posteriormente ser mantido a -70°C até determinação da atividade da catalase.

A atividade da catalase foi determinada de acordo com Azevedo *et al.* (1998) com modificações. Em cubeta de quartzo foi pipetado o extrato enzimático com o tampão fosfato de potássio, acrescentando o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), tendo como branco o meio de reação livre de H₂O₂. A cubeta então foi levada ao espectrofotômetro (Cary 50 Bio, Varian, Austrália) para leitura da absorbância a 240 nm durante a decomposição do H₂O₂ por 2 minutos.

5.5 Mensuração dos níveis de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

A mensuração dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi realizada de acordo com o método modificado de Loreto e Velikova (2001). A gema (0,05g) foi macerada na presença de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA 1%). O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Foram acrescentados 0,5 ml de tampão fosfato (pH 7,0) em 0,5 ml do sobrenadante. Em seguida, foi acrescentado 1 ml de iodeto de Potássio (KI). Então foi utilizado 0,3 ml da mistura descrita acima (tampão fosfato + sobrenadante + KI) e feita a leitura da absorbância a 390 nm em espectrofotômetro (µQuant, BioTek, Reino Unido).

5.6 Avaliação da atividade respiratória no escuro (R_d) durante o período de quebra de dormência e brotação

A taxa respiratória no escuro de gemas individuais foi determinada com o auxílio de um sistema portátil de medições de trocas gasosas (IRGA), modelo LI-6200 (LI-COR, USA). A concentração de CO_2 utilizada foi de $390 \mu\text{mol mol}^{-1}$. As análises ocorreram na bancada do laboratório.

A câmara de 250 ml (Figura 4E), contendo as gemas, foi envolvida por um pano de cor negra (Figura 4D) durante as análises, evitando assim, qualquer luminosidade do meio que pudesse induzir à fotossíntese pelos tecidos adjacentes das gemas. Então, o CO_2 liberado durante a atividade respiratória das gemas, foi captado na câmara e levado até o analisador de gás infravermelho (Figura 4B) através das mangueiras (Figura 4C), onde o CO_2 foi quantificado. A conversão do sinal analógico em sinal digital foi realizada pelo computador (Figura 4A) do equipamento.

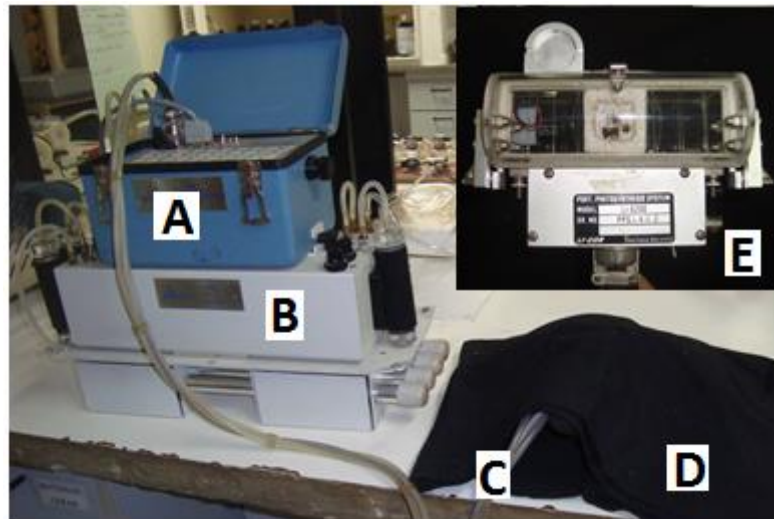


Figura 4. Sistema portátil de medições de trocas gasosas modelo LI-6200 (LI-COR, Lincoln, NE, USA); sendo subdividido em: (A) computador, (B) IRGA - Analisador de gás por infravermelho, (C) Mangueiras, (D) pano preto e (E) câmara em destaque.

5.7 Análise estatística

Foi calculado o intervalo de confiança a partir da média populacional dos dados. Teste de variância (teste F em 5% de probabilidade) foi calculado para os dados do tratamento com cianamida hidrogenada. Teste de médias de Tukey apenas para os dados da taxa respiratória do tratamento com as temperaturas. Os resultados foram obtidos a partir de cálculos no Microsoft Excel e a partir do programa computacional estatístico Saeg.

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1 – Inter-relação entre evolução da brotação, atividade da catalase, níveis de H_2O_2 e respiração de gemas tratadas com aplicação de Cianamida Hidrogenada.

A Figura 5 apresenta graficamente, a evolução da brotação (Figura 5A), a atividade da catalase (Figura 5B), os níveis de H_2O_2 (Figura 5C) e a respiração das gemas (Figura 5D) tratadas com aplicação de cianamida hidrogenada (CH). Para se obter a porcentagem das brotações observadas após aplicação da CH foi realizada a contagem das mesmas que foram iniciando brotação. Esse acompanhamento das brotações, ocorreu visualmente a cada 2 dias, e serviu para calcular o índice BR50.

Com apenas oito dias após aplicação da CH, 29% das brotações foram observadas (Figura 5A). A contagem foi contabilizada quando o intumescimento das gemas se tornou visível, como mostra os estágios da brotação B e C na Figura 6.

Após o início das brotações no 8º dia depois de iniciado o tratamento, as brotações seguintes ocorreram de forma rápida, com um aumento significativo do 8º para o 10º dia e um aumento ainda maior do 10º para o 12º dia. O índice BR50, período no qual 50% das gemas tiveram sua dormência quebrada, foi atingido entre o 10º e 12º dia após aplicação de CH (Figura 5A).

O curto espaço de tempo entre a aplicação da CH versus início e homogeneidade das brotações, reflete claramente a eficácia deste produto como um indutor de brotação na videira Niagara Rosada.

Pouco antes de BR50 ser atingido, ocorreu uma queda substancial na atividade da catalase, com redução máxima no 10º dia (Figura 5B). Relacionando a grande diminuição da atividade da catalase entre o 8º e o 10º dia com o BR50 em um período próximo, pode-se claramente observar uma correlação existente entre os dois acontecimentos. Isto demonstra que a quebra da dormência, através do uso de CH, é influenciada pela diminuição da atividade da catalase. No mesmo período, os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apresentaram um aumento significativo, passando de zero para 0,018 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF (Figura 5C). Enquanto a taxa respiratória de gemas no escuro (Rd) mostrou padrão de diminuição até o 9º dia após a aplicação da CH, apresentando um aumento logo em seguida (Figura 5D).

Os eventos de diminuição da atividade da catalase, aumento dos níveis de H_2O_2 e aumento da taxa respiratória em períodos muito próximos sugerem que a redução da atividade da catalase gerou aumento dos níveis de H_2O_2 e aumento da taxa respiratória, e como consequência, as gemas brotaram. Tais eventos são similares aos observados por Pérez et al (2008).

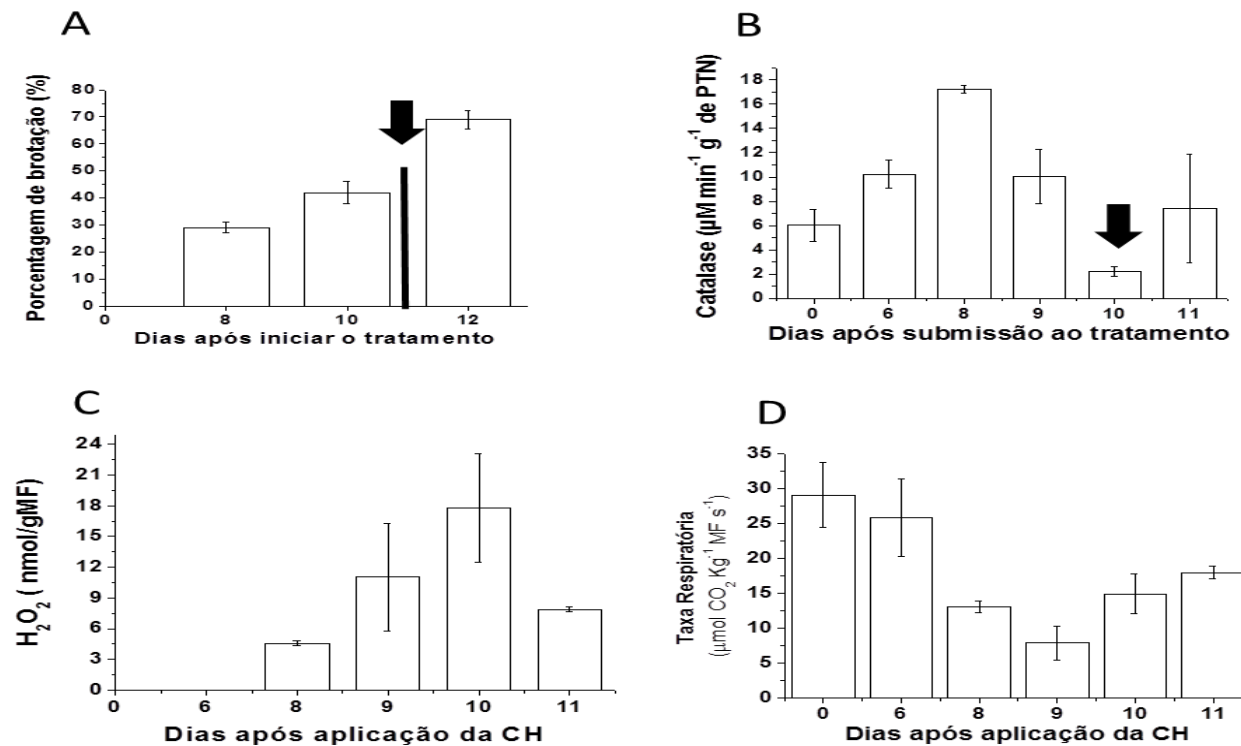


Figura 5. Evolução da brotação, atividade da catalase, níveis de H₂O₂ e respiração de gemas tratadas com aplicação de cianamida hidrogenada (CH), sendo: (A) porcentagens das brotações observadas a cada 2 dias, após aplicação da CH. A Seta indica o provável dia em que BR50 foi atingida. (B) Atividade da catalase após aplicação de CH. A seta indica o dia no qual 50% das brotações foram alcançadas, momento em que foi observada uma queda brusca da atividade enzimática. (C) níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tecidos da gema após aplicação de CH. (D) taxa respiratória no escuro (Rd) de gemas tratadas com CH. O intervalo de confiança, a partir da média populacional dos dados, é mostrado através das barras nos gráficos.



Figura 6. Evolução da brotação de gemas de videira Niagara Rosada após aplicação de cianamida hidrogenada, desde a gema dormente (estágio A) até o início do aparecimento das primeiras folhas (Estágio F).

6.2 Experimento 2 – Evolução da brotação, atividade da catalase e respiração de gemas tratadas com alta e baixa temperatura.

Conforme mostrado na Figura 7A, comparando o tratamento a 27°C com o pré-tratamento a 8°C antes da exposição desses ramos às condições térmicas ótimas para brotação, observou-se uma maior rapidez e uniformidade nas brotações que não receberam o pré-tratamento com baixa temperatura, em relação às gemas que passaram pelo frio.

As gemas tratadas a 27°C alcançaram 50% do total das brotações com 12 dias após o início do tratamento (Figura 7A). Neste momento foi observado um pico da taxa respiratória (Figura 8A). A catalase teve sua atividade diminuída no 4º dia (Figura 7B), o que parece ter sinalizado para o início das brotações no 8º dia e posterior alcance de BR50 no 12º dia.

Em contrapartida, as gemas que passaram pelo pré-tratamento a 8°C por 16 dias, necessitaram de 37 dias após início das brotações para que 50% das mesmas brotassem, ou seja, 21 dias depois de retirado da baixa

temperatura, para alcançar BR50 (Figura 7A). As taxas respiratórias destas gemas aumentaram assim que removidas da baixa temperatura, com posterior queda no 2º, 3º e 4º dia após retiradas de 8°C para 27°C (Figura 8A). A catalase teve sua atividade diminuída no 4º dia após as gemas terem sido retiradas da baixa temperatura, o que pode estar relacionado com o início das brotações neste período (Figura 7B).

Quando a CH foi utilizada antes de iniciar o tratamento a 27°C e também anteriormente ao pré-tratamento a 8°C, houve uniformidade nas brotações (Figura 7A).

As gemas tratadas a 27°C atingiram BR50 no dia em que iniciaram as brotações, com 8 dias após início do tratamento (Figura 7A). A taxa respiratória foi elevada durante todo o período do experimento (Figura 8B).

As gemas pré-tratadas a 8°C alcançaram BR50 com 5 dias depois que foram removidas da baixa temperatura (Figura 7A). A taxa respiratória aumentou assim que as gemas foram retiradas da temperatura baixa, com posterior queda no 2º e 3º dias após removidos de 8°C para 27°C (Figura 8B). Momento este, no qual as brotações foram iniciadas.

Comparando os dois tratamentos da Figura 7B, as gemas tratadas a 27°C apresentaram maior atividade de catalase comparado às pré-tratadas com baixa temperatura.

Comparando os dois tratamentos apresentados na Figura 8A, não houve significância, através do teste de Tukey, entre as gemas tratadas a 27°C e as que passaram pelo pré-tratamento a 8°C, seguidos de 27°C. Em relação aos dois tratamentos apresentados na Figura 8B, também não houve significância, através do teste de Tukey. Porém, comparando os quatro tratamentos apresentados na Figura 8 A e B, apenas as gemas tratadas a 27°C com aplicação de CH e as pré-tratadas a 8°C sem aplicação de CH foram significativamente diferentes entre si, pelo teste de Tukey.

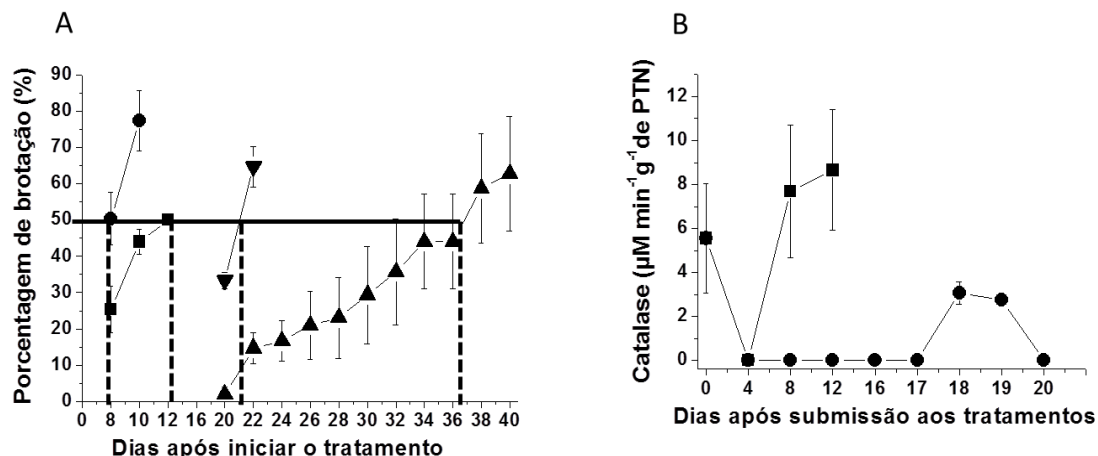


Figura 7. Percentagem das brotações e atividade da catalase em gemas de Niagara Rosada, sendo (A) Percentagem de brotação observada após início dos seguintes tratamentos: (■) temperatura a 27°C; (●) 27°C e aplicação de CH; (▲) 16 dias de pré-tratamento a 8°C, com posterior tratamento a 27°C; (▼) 16 dias de pré-tratamento a 8°C em gemas com CH e posterior tratamento a 27°C. Linhas pontilhadas indicando os prováveis dias em que BR50 foi atingida. (B) Atividade da catalase em gemas submetidas à (■) temperatura de 27°C; (●) 16 dias de pré-tratamento a 8°C, com posterior tratamento a 27°C. O intervalo de confiança, a partir da média populacional dos dados, é mostrado através das barras nos gráficos.

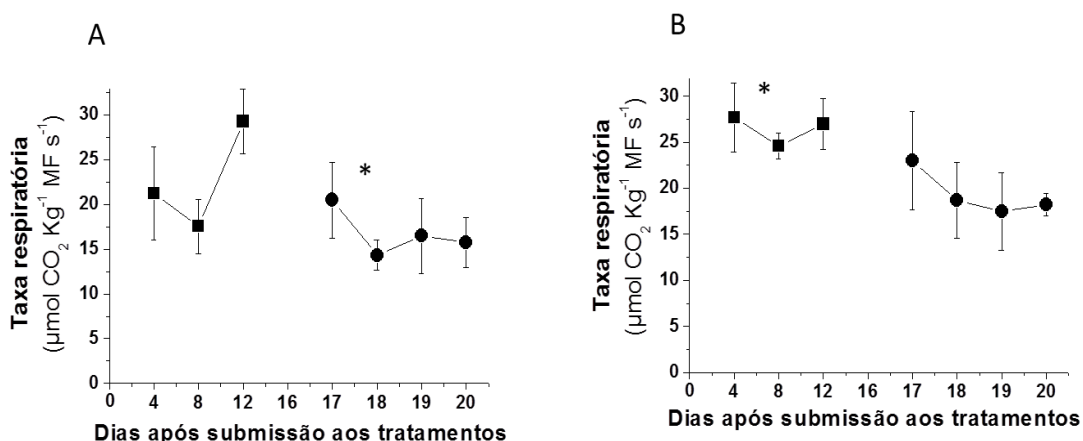


Figura 8. Taxa respiratória no escuro de gemas de videira Niagara Rosada (A) sem uso de cianamida hidrogenada, sob (■) temperatura de 27°C; (●) 16 dias

de pré-tratamento a 8°C, com posterior tratamento a 27°C; e também (B) com uso de cianamida hidrogenada, sob (■) temperatura de 27°C; (●) 16 dias de pré-tratamento a 8°C com posterior submetimento a 27°C. O asterisco (*) indica os tratamentos significativamente diferentes pelo teste de Tukey. O intervalo de confiança, a partir da média populacional dos dados, é mostrado através das barras nos gráficos.

7. DISCUSSÃO

A Cianamida Hidrogenada (CH), como já mencionado anteriormente, induz à brotação de gemas promovendo uniformidade de brotações em vinhedos comerciais (Vergana e Pérez, 2010). Neste cenário, Pérez e Lira (2005) observaram 50% de quebra de dormência, oito semanas após aplicação da CH, em região de inverno menos rigoroso, enquanto resultados apresentados por Martínez *et al* (2009), descrevem 23 dias para as gemas cultivadas em região climaticamente similar à descrita anteriormente atingirem BR50.

No presente experimento, entretanto, 50% das gemas tiveram sua dormência quebrada entre o 10º e 12º dia após aplicação de CH. Este resultado reflete claramente a eficácia deste produto como um indutor de brotação na videira Niagara Rosada. Obviamente as condições climáticas no período pré-experimental devem ter influenciado esta resposta. A maioria dos estudos realizados com brotação de gemas de videira tem sido realizada com plantas crescendo em regiões temperadas (Or et al., 2000, 2002, 2009; Zion et al., 2012), quando muito em regiões subtropicais (Pérez et al., 2007; Vergara e Pérez, 2010). Em regiões subtropicais, parece que a ocorrência de altas temperaturas durante o inverno provoca brotações erráticas nas gemas.

Em um clima tropical, como fica evidenciado pelas condições em que as plantas do presente experimentos foram cultivadas, a ocorrência de altas temperaturas é notória, mesmo no inverno (Hespanhol-Viana, 2009). É possível

que as altas temperaturas durante o ano tenham limitado as gemas à entrada em endodormência, mesmo no inverno, o que explicaria a facilidade da indução da brotação pela CH.

Mesmo assim, pouco antes de BR50 ser atingido, entre o 8º e 9º dia após pincelamento da CH, ocorreu uma queda substancial na atividade da catalase. Essa queda foi ainda maior entre o 9º e 10º dia depois de aplicado a CH. Isto demonstra que a quebra da dormência, através do uso de CH, tem relação com a diminuição da atividade da catalase (Nir et al., 1986; Or et al., 2002; Pérez e Lira, 2005; Pérez et al., 2008; Mohamed et al., 2012).

Enquanto a atividade da catalase diminuiu do 8º para o 10º dia, os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apresentaram um aumento significativo para o mesmo período. Relacionando esses dados com o aumento da taxa respiratória do 9º para o 11º dia, é possível sugerir que a redução da atividade da catalase gerou aumento dos níveis de H_2O_2 e aumento da taxa respiratória. Situações como esta são descritas em vários estudos, e mostram que, em resposta, as gemas brotam. Tais eventos são similares aos observados por Pérez et al (2008), que ainda mencionam que o estresse oxidativo leva a um distúrbio respiratório transitório e conseqüentemente as gemas são liberadas da dormência.

Parece não haver consenso se o excesso de H_2O_2 pode afetar diretamente ou agir como um sinal químico que desencadeia a expressão de genes relacionados com a liberação da dormência (Pérez e Lira, 2005). Neste contexto, Or et al. (2002), Halaly et al., (2008) e Mohamed et al., (2012) notaram, em seus experimentos, uma redução dos níveis de transcritos da catalase em gemas tratadas com CH, paralelamente à redução em sua atividade. Entretanto, parece que a redução da atividade da catalase tem forte relação com o aumento dos níveis de H_2O_2 . Este, por sua vez, promoveria um “oxidative burst”, ou seja, uma explosão oxidativa nos tecidos da gema, de tal forma que resultaria na brotação da gema. Esta descrição é conhecida, mas ainda não se conhecem os fatores que induzem à diminuição da atividade da catalase, seja pelos fatores do ambiente, seja pelo uso da CH.

Conforme já mencionado, a exposição da videira à baixa temperatura durante o repouso hibernar é importante para promover brotações mais rápidas e uniformes. Dokoozlian (1999) observou brotações mais rápidas e uniformes

com o aumento das horas de exposição ao frio. Mas, os estudos disponíveis sobre exposição ao frio levam em consideração que as gemas expostas a baixas temperaturas estavam ainda ligadas à planta-mãe, e que essa exposição foi devida ao período invernal.

Em ramos destacados, como estacas, não há ainda um consenso, mas as respostas ao frio podem ser divergentes. Considerando que as plantas de Niagara Rosada, cujas estacas foram utilizadas nos experimentos, foram sujeitas a frio ameno, oriundo de uma região tropical, foi pensado que um curto período adaptativo a 8°C diretamente nas estacas pudesse resultar em um melhor poder de brotação.

Portanto, comparando as estacas expostas a 27°C com estacas pré-tratadas a 8°C, seguidas de exposição a 27°C, o efeito do choque térmico parece ter retardado as brotações (dado pelo BR50). Maior rapidez e uniformidade nas brotações, portanto, foram observadas nas estacas que não receberam o pré-tratamento, que foram expostas a condições ótimas de temperatura.

Concomitante ao alcance do BR50 nas estacas submetidas a 27°C, (12 dias após o início dos tratamentos), ocorreu um pico na atividade respiratória das gemas como também da atividade da catalase. Entretanto, se analisar os períodos que antecederam o pico de atividade de catalase, observa-se que a atividade da catalase foi praticamente nula aos 4 dias após o início dos tratamentos, o que confirma, a princípio, que a inibição transitória desta enzima antecede a redução da atividade respiratória, observada no 8º dia. Tem sido relatado que a diminuição transitória da atividade respiratória é devida à redução do metabolismo oxidativo, favorecendo o metabolismo fermentativo (Pérez et al., 2007).

Em contrapartida, as gemas que passaram pelo pré-tratamento a 8°C, necessitaram de 21 dias depois de retirado da baixa temperatura, para atingir BR50. As taxas respiratórias destas gemas aumentaram assim que removidas da baixa temperatura, com posterior queda no 2º, 3º e 4º dia após retiradas de 8°C para 27°C. A catalase teve sua atividade diminuída no 4º dia após as gemas terem sido retiradas da baixa temperatura, o que pode estar relacionado com o início das brotações neste período.

Conforme ilustrado através da Figura 2, Nir et al. (1986) constataram significativa diminuição na atividade da catalase de gemas tratadas com baixa temperatura artificial (5°C) em comparação à gemas mantidas à temperatura ambiente (23-28°C).

Nossos resultados indicam que videiras Niagara Rosada cultivadas em regiões de invernos não vigorosos, quando expostas à baixa temperatura, parecem necessitar de um ajuste temporal para que suas atividades metabólicas sejam restabelecidas, quando retornam às temperaturas ótimas para brotação. Tais avaliações vêm de encontro aos estudos de Dokoozlian (1999), que mostrou que uma breve exposição à baixa temperatura (durante 50h) aumentou significativamente a quebra da dormência, comparada a gemas não expostas. Ainda neste estudo, gemas tratadas a 7,5°C por 400 h, atingiram BR50 em pouco menos de 30 dias. Em contrapartida, as gemas controle (0 h de exposição à baixa temperatura) necessitaram de 60 dias para que apenas 35% de brotação ocorressem.

As gemas tratadas a 27°C atingiram BR50 no dia em que iniciaram as brotações, com 8 dias após início do tratamento. A taxa respiratória foi elevada durante todo o período do experimento, ao passo que as gemas pré-tratadas a 8°C alcançaram BR50 6 dias depois que as gemas foram removidas da baixa temperatura. A taxa respiratória foi reduzida assim que as gemas foram retiradas da temperatura baixa, porém mostrou tendência de aumento no 4º dia após removidos de 8°C para 27°C. Estes resultados comprovam ainda mais a eficácia deste produto (CH) como um indutor de brotação na videira Niagara Rosada, nas condições em que foram cultivadas.

Na mensuração da taxa respiratória dos tratamentos, apenas diferiram estatisticamente as gemas tratadas a 27°C com aplicação de CH e as pré-tratadas a 8°C sem aplicação de CH. Este resultado, juntamente com a observação que as gemas tratadas com CH atingiram BR50 mais rapidamente que quando tratadas com frio, sugere que videiras Niagara Rosada cultivadas em regiões com invernos amenos não respondem de forma semelhante à CH e à baixa temperatura, semelhante aos resultados obtidos por Pérez e Lira (2005 e Vergara e Pérez, 2007). Nir et al. (1986) comprovaram semelhante redução da atividade da catalase em gemas também submetidas a tratamento com CH e baixa temperatura.

Estes resultados demonstram que os mecanismos bioquímicos ligados à brotação das gemas de videiras em clima tropical se comportam de modo similar aos climas temperados. Porém, a velocidade e a taxa de brotação entre plantas oriundas destes climas mostram padrões diferentes. Uma de nossas teorias é que a falta de períodos prolongados de baixas temperaturas (possivelmente abaixo de 15°C) não é suficiente para que as gemas entrem em endodormência. O estado de endodormência é essencial para que a planta suporte as condições inverniais, quando estas são significantes. Observamos, também, que a pré-indução de temperatura baixa (8°C) em estacas não resultou em maior indução de brotação; tudo indica que o efeito físico da baixa temperatura tenha influenciado as taxas metabólicas em geral, o que retardou significativamente a velocidade da brotação, medida pelo BR50.

8. CONCLUSÃO

- Houve diminuição na atividade da catalase e aumento dos níveis de H_2O_2 anteriormente à brotação e aumento da taxa respiratória no momento da liberação da dormência;
- Gemas de videiras Niagara Rosada cultivadas sob alta temperatura não respondem de forma semelhante à CH e ao pré-tratamento na indução da brotação;
- Há eficácia da Cianamida hidrogenada (CH) como um indutor de brotação na videira Niagara Rosada, mesmo quando as estacas foram pré-tratadas a 8°C.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo, R. A.; Alas, R. M.; Smith, R. J. Lea, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104, 280-292, 1998.

Chelikani, P.; Fita, I. e Loewen, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 192-208, 2004.

Dokoozlian, N.K. Chilling Temperature and Duration Interact on the Budbreak of 'Perlette' Grapevine Cuttings. *HortScience* 34, 1-3, 1999.

El-Shereif, A. R.; Mizutani, F.; Onguso, J. M.; S. Hossain. Effects of Different Temperatures and Sampling Dates on Bud Break and ACC Content of 'Muscat Bailey A' Grapevine Buds. *International Journal of Botany*, 1(1), 34-37, 2005.

Grant, T. N.L.; Gargrave, J.; Dami, I. E. Morphological, Physiological, and Biochemical Changes in *Vitis* Genotypes in Response to Photoperiod Regimes. *Am. J. Enol. Vitic.* 64:4, 446-475, 2013.

Halaly, T; Pang, X; Batikoff, T; Crane, O; Keren, A; Venkateswari, J; Ogdovitch, A; Sadka, A; Lavee, S; Or, E. Similar mechanisms might be

triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds. *Planta* 228, 79-88, 2008.

Hespanhol-Viana, L. Fenologia e quebra de dormência da videira Niagara Rosada cultivada na região norte fluminense em diferentes épocas de poda. Tese DS em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009.

Keilin, T., Pang, X., Venkateswari, J., Halaly, T., Crane, O., Keren, A., Grodovitch, A., Ophir, R., Volpin, H., Galbraith, D., Or, E. Digital expression profiling of a grape-bud EST collection leads to new insight into molecular events during grape-bud dormancy release. *Plant Science*, 173, 446–457, 2007.

Keller, M. and Tarara, J. M. Warm spring temperatures induce persistent season-long changes in shoot development in grapevines. *Annals of Botany* 106, 131–141, 2010.

Koussa, T; Broquedis, M. Bouard, J. Changes of abscisic acid level during the development of grape latent buds, particularly in the phase of dormancy break. *Vitis* 33, 63–67, 1994.

Lang, G. A. Dormancy a new universal terminology. *Hortic Sci*, 22, 817-20, 1987.

Lavee, S. Dormancy and break in warm climates; consideration of growth regulator involvement. *Acta Horticulturae*, 34, 255-264, 1973.

Leão, P. C. S.; Maia, J. D. G. Aspectos culturais em viticultura tropical uva de mesa. *Informe agropecuário*, 19, 34-39, 1998.

Loreto, F and Velikova, V. Isoprene Produced by Leaves Protects the Photosynthetic Apparatus against Ozone Damage, Quenches Ozone Products,

and Reduces Lipid Peroxidation of Cellular Membranes. *Plant Physiology* 127, 1781–1787, 2001.

Martínez, M. A. T.; Orozco, J. A.; Vargas, G. A.; Millán, E. C.; Gardea, A. A. Metabolic Activity of Low Chilling Grapevine Buds Forced to Break. *Termochimica Acta* 481, 28-31, 2009.

Mathiason, K.H.D., Grimplet, J., Venkateswari, J., Galbraith, D.W., Or, E., Fennell, A. Transcript profiling in *Vitis riparia* during chilling requirement fulfillment reveals coordination of gene expression patterns with optimized bud break. *Funct. Integr. Genomics* 9, 81-96, 2009.

Mohamed, H. B.; Vadel, A. M.; Geuns, J. M. C.; Khemira, H. Biochemical changes in dormant grapevine shoot tissues in response to chilling: Possible role in dormancy release. *Scientia Horticulturae*, 124, 440-447, 2010.

Mohamed, H. B.; Vadel, A. M.; Geuns, J. M. C.; Khemira, H. Effects of hydrogen cyanamide on antioxidant enzymes' activity, proline and polyamide contents during bud dormancy release in Superior Seedless grapevine buds. *Acta Physiol Plant*, 34, 429-437, 2012.

Murakami, K. R. N. Caracterização fenológica da videira cv. Itália (*Vitis vinifera* L.) sob diferentes épocas de poda na região norte do Estado do Rio de Janeiro. Dissertação (mestrado), Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2002.

Nir, G.; Shulman, Y.; Fanberstein, L.; Lavee S. Changes in the Activity of Catalase (EC 1.11.1.6) in Relation to the Dormancy of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Buds. *Plant Physiol.*, 81, 1140-1142, 1986.

Or, E.; Viložny, I.; Fennell, A.; Eyal, Y.; Ogródovitch, A. Dormancy in grape buds: isolation and characterization of catalase cDNA and analysis of its expression following chemical induction of bud dormancy release. *Plant Science*, 162, 121–130, 2002.

Or, E. *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. 2nd edn., Springer Science+Business Media B. V. 2009.

Or, E.; Vilozny, I.; Eyal, Y.; Ogródovitch, A. The transduction of the signal for grape bud dormancy breaking induced by hydrogen cyanamide may involve the SNF-like protein kinase GDBRPK. *Plant Molecular Biology*, 43, 483–494, 2000.

Pang, X., Halay, T., Crane, O., Kellin, T., Keren, A., Ogródovitch, A., Galbraith, D., Or, E. Involvement of calcium signalling in dormancy release of grape buds. *J Exp Bot*, 58, 3249–3262, 2007.

Pedro Júnior, M. J.; Sentelhas, P. C.; Pommer, C. V.; Martins F. P.; Gallo, P. B.; Santos R. R.; Bovi, V.; Sabino, J. C. Caracterização fenológica da videira 'Niagara Rosada' em diferentes regiões paulistas. *Bragantia*, 52, 153-160, 1993.

Pérez, F. J.; Lira, W. Possible role of catalase in post – dormancy buds break in grapevines. *Journal of Plant Physiology*, 162, 301-308, 2005.

Pérez, F. J.; Rubio, S.; Núñez, J. O. Is erratic bud-break in grapevines grown in warm winter areas related to disturbances in mitochondrial respiratory capacity and oxidative metabolism. *Functional Plant Biology*, 34, 624-632, 2007.

Pérez, F. J.; Vergara, R.; Rubio, S. H₂O₂ is involved in the dormancy-breaking effect of hydrogen cyanamide in grapevine buds. *Plant Growth Regul*, 2008.

Pérez, F. J.; Vergara, R., Or, E. On the mechanism of dormancy release in grapevine buds: a comparative study between hydrogen cyanamide and sodium azide. *Plant Growth Regul*, 59, 145–152, 2009.

Petri, J. L.; Palladini, L. A.; Schuck, E.; Ducroquet, J. H. J.; Matos, C. S.; Pola, A. C. *Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado*. Florianópolis, Epagri, 110p, 1996.

Pires, E. J. P. Emprego de reguladores de crescimento em viticultura tropical. *Viticultura tropical, informe agropecuário*, 19, 40-43, 1998.

Sentelhas, P. C. Aspectos climáticos para a viticultura tropical. *Informe agropecuário*, 19, 9-14, 1998.

Silva, F. C. C.; Viana, A. P.; Silva, M. G. O.; Oliveira, J. G.; Gomes Filho, A. Caracterização química e determinação dos estádios fenológicos de variedades de videiras cultivadas no norte fluminense. *Rev. Bras. Frutic.*, 30, 038-042, 2008.

Souza, G. M. Desenvolvimento e morfologia de inflorescências em videira 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L.). Tese (doutorado), Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2013.

Srinivasan, C.; Mullins, M. G. Physiology of flowering in the grapevine - a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, 47-63, 1981.

Vergana, R.; Pérez, F. J. Similarities between natural and chemically induced bud-endodormancy release in grapevine *vitis vinífera* L. *Scientia Horticulturae*, 125, 648-653, 2010.

Wake, C. M. F. and Fennell, A. Morphological, physiological and dormancy responses of three *Vitis* genotypes to short photoperiod. *Physiologia Plantarum*, 109, 203–210, 2000.

Zion, B.a, Arbel, A.a, Halaly, T.b, Regev, R.c, Barak, M.c, Lidor, G.c, Weissblum, A.c, Harcabi, E.d, Or, E. A heat-shock generator for dormancy release of grapevines in the vineyard. *Transactions of the ASABE*, 55, 753-758, 2012.