

SINALIZAÇÃO FOTOPERIÓDICA: DORMÊNCIA DE GEMAS E
ACLIMATAÇÃO EM *Vitis vinifera* L. CULTIVADA EM REGIÃO
TROPICAL DE BAIXA LATITUDE

DEBORA JESUS DANTAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
NOVEMBRO – 2014

SINALIZAÇÃO FOTOPERIÓDICA: DORMÊNCIA DE GEMAS E
ACLIMATAÇÃO EM *Vitis vinifera* L. CULTIVADA EM REGIÃO
TROPICAL DE BAIXA LATITUDE

DEBORA JESUS DANTAS

Tese 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 Doutora em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
NOVEMBRO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 006/2016

Dantas, Debora Jesus

Sinalização fotoperiódica: dormência de gemas e aclimação em *Vitis vinifera* L. cultivada em região tropical de baixa latitude / Debora Jesus Dantas. – 2016.

85 f. : il.

Orientador: Ricardo Enrique Bressan-Smith

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2016.

Bibliografia: f. 58 – 63.

1. Genes integradores florais 2. Fitocromos 3. Videira 4. Meristema 5. Fotoperíodo I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

Cutter–
D192s

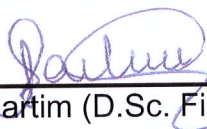
SINALIZAÇÃO FOTOPERIÓDICA: DORMÊNCIA DE GEMAS E
ACLIMATAÇÃO EM *Vitis vinifera* L. CULTIVADA EM REGIÃO
TROPICAL DE BAIXA LATITUDE

DEBORA JESUS DANTAS

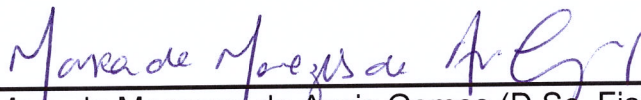
Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal.

Aprovada em 28 de novembro de 2014

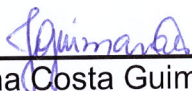
Comissão Examinadora



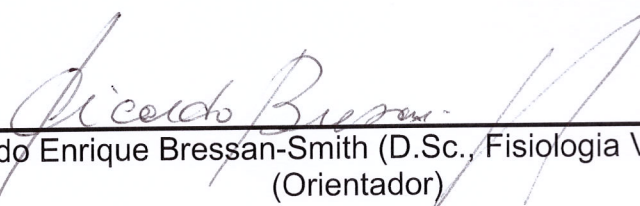
Profª Sílvia Aparecida Martim (D.Sc. Fisiologia Vegetal) - UFRRJ



Profª Mara de Menezes de Assis Gomes (D.Sc. Fisiologia Vegetal) – FAETC



Juliana Costa Guimarães (D.Sc., Fisiologia Vegetal) – PMCG



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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Melhoramento Vegetal, Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização deste curso;

A CAPES, pela bolsa de estudos, muito obrigada!

Ao meu orientador, Prof. Dr Ricardo Enrique Bressan-Smith, pelo importante auxílio prestado, pela amizade, meu respeito, muito obrigada!

À Dr^a. Juliana Costa Guimarães, ao Dr. Leandro Hespanhol e ao Dr. Gleidson Souza, pela disposição de tempo, empenho, paciência e amizade, minha gratidão!

A todos os colegas, e acima de tudo, amigos do Laboratório de Melhoramento Vegetal, em especial a Ivanice Borges, Alex Soares, Joviana Lerin, Bruna Correa, José Neto, Thiara Chagas, Clara Coutinho, Prof. Dr. Mara de Menezes, pelo incentivo, carinho e amizade, obrigada!

Agradeço a todos os meus familiares, principalmente à minha mãe Josefa Ferreira, a meu irmão Django Jesus Dantas que estiveram ao meu lado para concretizar este ideal, incentivando a seguir e estiveram sempre presentes nesta caminhada, meu respeito, admiração e carinho incondicional, muito obrigada também ao meu primo Elvis Ferreira e meu namorado Diego Monnerat pelo apoio e compreensão, sem isso não teria chegado tão longe;

A Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Bioquímica Vegetal, Santiago, Chile, obrigada. Um agradecimento muito especial ao Prof. Dr Francisco J. Pérez e à sua equipe, que não mediram esforços para me ajudar nas análises de transcrição de genes;

A Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fruticultura, por me permitir realizar meu experimento de tese em seu campus, muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. HIPÓTESE.....	3
3.OBJETIVOS.....	4
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	4
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
4.1. Origem, distribuição, classificação botânica.....	5
4.2. Aspectos econômicos.....	6
4.3. Morfologia da gema de videira.....	7
4.4. Dormência em gemas.....	8
4.5. Modelos de regulação da dormência induzidos por fotoperíodo e temperatura.....	9
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
5.1. EXPERIMENTO 1: Influência do fotoperíodo sobre a aclimação em gemas de <i>Vitis vinifera</i> L. 'Itália Melhorada' cultivada em região tropical.....	13
5.1.1. Material vegetal e localização.....	13
5.1.2. Tratamentos de fotoperíodo.....	14
5.1.3. Delineamento experimental.....	15
5.1.4. Avaliações realizadas no experimento.....	16

5.1.4.1. Acompanhamento do desenvolvimento da periderme no ramo.....	16
5.1.4.2. Crescimento dos ramos e número de nós.....	16
5.1.4.3. Conteúdo relativo de água nos tecidos dos nós.....	16
5.1.4.4. Abundância relativa de transcrição de genes relacionados à indução de dormência.....	17
5.1.4.4.1. Coleta, processamento e armazenamento do material vegetal.....	17
5.1.4.4.2. Extração e purificação de RNA e DNAC.....	18
5.1.4.4.3. PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-QPCR).....	19
5.1.4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	20
5.2. EXPERIMENTO 2 - Fenologia e produção de <i>Vitis vinifera</i> L. 'Itália Melhorada' cultivada em região tropical de baixa latitude.....	20
5.2.1. Caracterização da área experimental.....	20
5.2.2. Material vegetal.....	22
5.2.3. Delineamento experimental.....	23
5.2.4. Avaliações realizadas no experimento.....	23
5.2.4.1. Fenologia do ciclo de produção (poda-colheita).....	23
5.2.4.2. Caracterização qualitativa das bagas.....	26
5.2.4.3. Peso médio das bagas.....	26
5.2.4.4. Sólidos Solúveis Totais (°BRIX).....	26
5.2.4.5. Acidez Total Titulável (% Ácido Tartárico).....	26
5.2.4.6. Relação entre Sólidos Solúveis Totais e Acidez Titulável.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1. EXPERIMENTO 1 - Influência do fotoperíodo sobre a aclimação em gemas de <i>Vitis vinifera</i> L. 'Itália Melhorada' cultivada em região tropical.....	28
6.2. EXPERIMENTO 2 - Fenologia e produção de <i>Vitis vinifera</i> L. 'Itália Melhorada' cultivada em região tropical de baixa latitude.....	43
7. DISCUSSÃO.....	48
8. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8. APÊNDICES: TRABALHOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DOS DADOS DA TESE.....	64
APÊNDICE A: Relationship between Endodormancy and Cold Hardiness in grapevine buds.....	65

APÊNDICE B: Relationship between Endodormancy, Flowering Locus T and
Cell Cycle Genes in *Vitis vinifera*..... 76

RESUMO

DANTAS, Debora Jesus, D.Sc., Fluminense Darcy Ribeiro. Novembro de 2014. Sinalização fotoperiódica: dormência de gemas e aclimação em *Vitis Vinifera* L. cultivada em região tropical de baixa latitude. Orientador: Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith.

A videira é uma frutífera de clima temperado que possui grande importância econômica mundialmente, sendo sua produtividade intimamente relacionada à saída do processo de dormência. Evidências sugerem que a indução e saída da dormência em climas temperados é regulada principalmente por baixas temperaturas e fotoperíodo. No entanto, em ambientes tropicais, caracterizado pela ausência de frio extremo, a dinâmica da dormência em gemas axilares de *Vitis vinifera* toma um aspecto totalmente distinto. Assim, este estudo teve como objetivo verificar o comportamento adaptativo de *Vitis vinifera* em condições controladas de fotoperíodo e o seu desempenho produtivo no campo em condições de baixa latitude (5°12'16"S) e de temperaturas altas. O trabalho foi dividido em dois experimentos, o experimento I foi desenvolvido em casa de vegetação, com condições controladas de fotoperíodo, com a finalidade de verificar a aclimação das plantas sob os tratamentos Controle (Fotoperíodo natural: 12 horas de luz), FC (Fotoperíodo curto: 10 horas de luz) e FL (Fotoperíodo longo: 14 horas de luz). Foram utilizadas plantas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' no estádio EL19 de desenvolvimento, que foram avaliadas durante oito semanas, quanto ao comprimento do ramo, número de nós, alterações citológicas, teor de água nos

tecidos e níveis de RNAm de VvPHYA, VvPHYB e VvFT em folhas e gemas (genes associados à aclimação e endodormência das gemas). No experimento I, as avaliações periódicas possibilitaram caracterizar o desenvolvimento da aclimação ao longo do período de oito semanas sob os tratamentos fotoperiódicos. Em condições de FC o nível de expressão de VvPHYA e VvFT foi reduzido em relação ao FL, induzindo a endodormência das gemas e aclimação das plantas, que apresentaram espessamento de parede celular nas células do meristema, maior formação de periderme, redução no teor de água nos tecidos e menor número de nós quando comparado ao FL. Já em condições de FL os VvPHYA e VvFT foram altamente expressos nas gemas e não foram observadas essas alterações anatômicas. Todas essas modificações relacionadas à aclimação ao frio ocorreram em altas temperaturas (31/29°C), de modo que os resultados sugerem que o FC induz a endodormência e aclimação por meio de uma via diferente a via mediada por baixa temperatura. O experimento II foi desenvolvido em campo a fim de analisar o desempenho reprodutivo da *Vitis vinifera*, para tal foi utilizada a ‘tália Melhorada’ sobre três porta-enxertos (IAC313, IAC572, IAC766). Foram avaliados ao longo de dois ciclos o comportamento fenológico e as características quantitativas e qualitativas da produção. A análise revelou diferenças entre ciclos para sólidos solúveis das bagas. Os porta-enxertos não influenciaram nenhum dos fatores avaliados (peso do cacho, comprimento do cacho, diâmetro do cacho, número de bagas, peso de bagas, comprimento da baga, diâmetro da baga) em nenhum dos dois ciclos de produção de ‘Itália Melhorada’, concluindo-se, portanto que os porta-enxertos podem ser usados indistintamente.

Palavras-chave: genes integradores florais, fitocromos, videira, meristema, fotoperíodo.

ABSTRACT

DANTAS, Debora Jesus, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. November, 2014. Photoperiodic signaling: Acclimatization and entry in dormancy in buds of the *Vitis vinifera* L. cultivated in region tropical low latitude. Advisor: Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith.

Grapevine is a temperate plant species which productivity is closely related to the output of dormancy process. Evidences suggest that the induction and output of dormancy in temperate climates is mainly regulated by low temperature and photoperiod. However, in tropical environments, characterized by low variations of photoperiod, absence of extreme cold, the dynamics of dormancy in axillary buds of *Vitis vinifera* takes a totally different aspect. Thus, this study aimed to verify the adaptive behavior of *Vitis vinifera* under controlled photoperiod conditions and their productive performance in low-latitude conditions (5°12'16 "S) subjected to constant high air temperature. We carried out two experiments: the Experiment I was developed in a greenhouse with controlled conditions of photoperiod, with the purpose of verifying the acclimatization of plants under the treatments ND (Natural Day - natural photoperiod: 12 hours of light), SD (Short Day - short photoperiod: 10 hours of light) and LD (Long Day - long photoperiod: 14 hours of light). We used plants of *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' in EL19 stage of development, which were evaluated for eight weeks for changes in growth, number of nodes, cytological changes, water content in tissues and the mRNA levels of VvPHYA, VvPHYB and

VvFT in leaves and buds (genes associated with acclimatization and endodormancy of buds). In the Experiment I, periodic evaluations allowed to characterize the development of acclimatization over eight weeks under the photoperiodic treatments. In SD conditions the level of VvPHYA and VvFT expression was reduced in relation to the LD, inducing endodormancy of the buds and acclimatization of the plants, which showed cell wall thickening in meristem cells, increased formation of periderm, reduction in water content tissue and less number of nodes compared to LD. In LD the VvPHYA and VvFT were highly expressed in the buds and these anatomical alterations were not observed. All such modifications related to cold acclimation occurred at higher temperatures (29/31°C), so these results suggest that SD induces endodormancy and acclimatization by a different pathway mediated via the low temperature. The second experiment was carried out in the field to analyze the reproductive performance of *Vitis vinifera*. We used the 'Itália Melhorada' variety on three rootstocks (IAC313, IAC572, IAC766). In this experiment, two cycles the phenological behavior and the quantitative and qualitative characteristics of production were evaluated. The analysis revealed differences in two cycles for soluble solids berries, regardless the rootstock. Rootstocks did not influence any of the evaluated variables (bunch weight, bunch length, bunch diameter, number of berries, berry weight, length berry, and berry diameter) in either production cycle of 'Itália Melhorada', concluding that the rootstock can be used interchangeably. We also conclude that the environmental conditions of low latitude tolerate the *Vitis vinifera* cultivation, but production in these conditions is only possible with the use of inducing sprouting chemicals.

Keywords: Floral integrator genes, phytochromes, vine, meristem, photoperiod.

1. INTRODUÇÃO

A videira é originária de regiões de clima temperado, que apresentam inverno rigoroso. Nesse tipo de ambiente a videira desenvolveu o mecanismo de dormência que confere condições de sobrevivência durante o período frio. Contudo, esta mesma espécie também é cultivada em condições tropicais, cuja ausência de estação com baixas temperaturas favorece a dominância apical, promovendo um contínuo e vigoroso desenvolvimento vegetativo.

Em regiões de clima tropical, o repouso vegetativo é induzido por déficit hídrico ou por tratamentos com reguladores de crescimento. Este período de repouso (colheita de um ciclo e a poda do ciclo seguinte) varia geralmente entre 30 a 60 dias. A redução da lâmina de irrigação é imprescindível para estimular o repouso das plantas (Leão, 2004).

Em condições de clima temperado, as gemas latentes, entram em dormência durante a estação fria do ano. A videira possui um complexo de gemas, constituído de dois tipos de gemas, a lateral ou “gema pronta” e a latente ou composta (Mullins et al., 1992, Winkler et al., 1997). A gema lateral forma-se na axila da folha e desenvolve-se no mesmo ciclo, formando brotações laterais (netos) (Pommer, 2003). A gema composta é formada junto à gema lateral, sendo constituída por três gemas em seu interior, uma gema primária central e duas gemas secundárias menores, recobertas por pelos e brácteas e são lentamente formadas durante o período de crescimento vegetativo (Mullins et al., 1992).

Tem sido relatado que a endodormência pode ser induzida exclusivamente por fotoperíodo curto em certos genótipos de *Vitis* (Fennell e Hoover, 1991; Wake e Fennell, 2000; Kühn et al., 2009) e, por isso, nos trópicos, sob fotoperíodo constante, as gemas não entram endodormência e se comportam como uma árvore perene de crescimento contínuo durante todo o ano. Apesar disso, o conceito de que o fotoperíodo não tem influência sobre a capacidade de indução de dormência em regiões tropicais pode cair, dado que existe uma variação no fotoperíodo ao longo das diferentes latitudes, mesmo em regiões tropicais. Mediante ao exposto, a avaliação das características anatômicas e moleculares das gemas submetidas a condições decrescentes de fotoperíodo, pode ser uma ferramenta útil para caracterizar a evolução da dormência de videiras cultivadas em regiões em que não ocorrem intenso frio hibernar.

2. HIPÓTESE

A hipótese é que as brotações irregulares de gemas de videira em regiões tropicais são resultado da mudança do padrão de indução e desenvolvimento de dormência, influenciado pela sinergia entre o fotoperíodo e a temperatura.

3.OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Verificar se o fotoperíodo tem influência sobre a indução de dormência, em gemas de *Vitis*, cultivadas em região tropical de baixa latitude e com déficit de frio hiberna e avaliar a fenologia e produção desta espécie nessas condições.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o estado de aclimação e dormência das gemas, por meio da quantificação de transcritos de VvPHYs e VvFT e as mudanças morfológicas nas plantas e células meristemáticas das gemas axilares.

Caracterizar a fenologia e produção nas condições de baixa latitude e altas temperaturas.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Origem, distribuição, classificação botânica

Os primeiros sinais da existência da videira datam da era pré-histórica, onde sementes da planta foram encontradas junto aos vestígios dos homens pré-históricos (Souza, 1996).

O provável centro de origem paleontológico, provavelmente, foi a Groenlândia, onde há 300 mil anos atrás, na Era Cenozoica, surgiu a primeira espécie de videira. A rota de dispersão da videira se deu em dois sentidos distintos: um américo-asiática e outro euro-asiática. A viticultura teve o seu início na Ásia Ocidental, entre a Armênia e a Pérsia (Giovannini, 1999).

A videira pertence ao grupo Cormófitas (plantas com raiz, talo, folha e autróficas), divisão *Spermatophyta* (planta com flor e semente), subdivisão *Angiospermae* (planta com semente dentro do fruto), classe *Magnoliopsida* (plantas com dois cotilédones, que originam as primeiras folhas), ordem Rhamnales (plantas lenhosas com um ciclo de estames situados dentro das pétalas), família *Vitaceae* (flores com corola de pétalas soldadas na parte superior e de prefloração valvar, com cálice pouco desenvolvido, gineceu bicarpelar e bilocular, com fruto tipo baga (Alvarenga, et al., 1998) .

A família *Vitaceae* pode ser dividida em dois gêneros: *Vitis* (de grande importância econômica, principalmente devido à produção de vinho e frutas) e *Cissus* (com algumas espécies de interesse medicinal e ornamental) (Souza, 1996).

O gênero *Vitis* pode, ainda, ser dividido em dois subgêneros: *Muscadínea*, nativo do Sudeste dos Estados Unidos e México, possuindo três espécies conhecidas, *Vitis rotundifolia* Michaux, *Vitis munsoniana* Simpson e *Vitis popenoi* Fennell (Galet, 1993), destacando-se a primeira como a mais importante e o subgênero *Euvitis* (compreendendo mais de 50 espécies). Dentro do subgênero *Euvitis*, encontra-se duas espécies de grande importância para a agricultura (*Vitis labrusca* e *Vitis vinifera*), seja para a produção de vinho, seja para o consumo “*in natura*” das frutas. A primeira é uma espécie de origem americana e apresenta características mais rústicas quanto à suscetibilidade a doenças; a segunda é uma espécie de origem europeia, responsável por mais de 90% dos vinhos fabricados no mundo (Giovannini, 1999).

4.2. Aspectos econômicos

A vitivinicultura é uma atividade de grande importância para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil e nos últimos anos, vem se destacando, também, na geração de emprego em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento (Mello, 2011).

A videira é a terceira fruteira em importância econômica no mundo, ocupando atualmente uma área de 7,4 milhões de hectares e com uma produção anual de 68 milhões de toneladas (FAO, 2011).

O Brasil possui uma área plantada de 83.718 hectares (Mello, 2011). Essas áreas encontram-se distribuídas, principalmente pelos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina e Bahia, em ordem decrescente (IBGE, 2010). Cabe destacar que a uva *in natura* foi a 6ª fruta mais exportada em 2010, rendendo ao país algo próximo de 136 milhões de dólares (IBRAF, 2011).

Segundo dados do IBGE, em 2010 ocorreu um aumento na área plantada e colhida de uvas no Brasil de 1,37% e 2,04%, respectivamente. Enquanto o Estado de Pernambuco teve sua área plantada ampliada em 23,89%, na Bahia ocorreu redução de 12,11%. O Estado de Santa Catarina apresentou aumento de 2,33% na área plantada. Nos demais Estados, as áreas permaneceram inalteradas ou apresentaram pequena redução. Embora não apareça nas estatísticas do IBGE, a

viticultura está sendo implantada em vários estados, como Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Ceará e Piauí (Mello, 2011).

4.3. Morfologia da gema de videira

A videira é uma planta perene arbustiva, constituída das seguintes partes: raízes, tronco, ramos, gemas, folhas, flores, gavinhas, frutos e sementes. As raízes, quando originadas de estacas, são fasciculadas e podem ser encontradas, na maior parte, dentro dos primeiros 60 a 150 cm de profundidade. No final do ciclo vegetativo, com a queda das folhas, as raízes são responsáveis pelo acúmulo de carboidratos, os quais servirão para o desenvolvimento inicial da planta no próximo ciclo (Winkler et al., 1997).

O ápice caulinar (gema apical), além de contribuir para o crescimento em comprimento (altura) do caule, origina os primórdios foliares e as gemas axilares, que aparecem na axila de cada folha. As gemas axilares são estruturalmente idênticas ao ápice caulinar. A videira (*Vitis* spp) possui um complexo de gemas axilares, que contém uma gema lateral e uma gema composta (Morrison, 1991; Gerrath, 1992). A gema lateral também conhecida como “gema pronta” (“*Prompt Bud*”), inicia-se na axila da folha e desenvolve-se em brotação lateral ou neto durante o mesmo ciclo de sua formação (Srinivasan e Mullins, 1981), não entrando em dormência, e quando não se desenvolve brotações, estas são geralmente abortadas (Morrison, 1991; Gerrath, 1992).

A gema composta, também denominada gema latente ou dormente, desenvolve-se na axila da bráctea formada junto à gema lateral e possui três componentes: a gema primária central e duas gemas secundárias menores (Figura 1). Cada componente da gema composta pode apresentar primórdios foliares e primórdios de inflorescência ou de gavinha (Morrison, 1991).

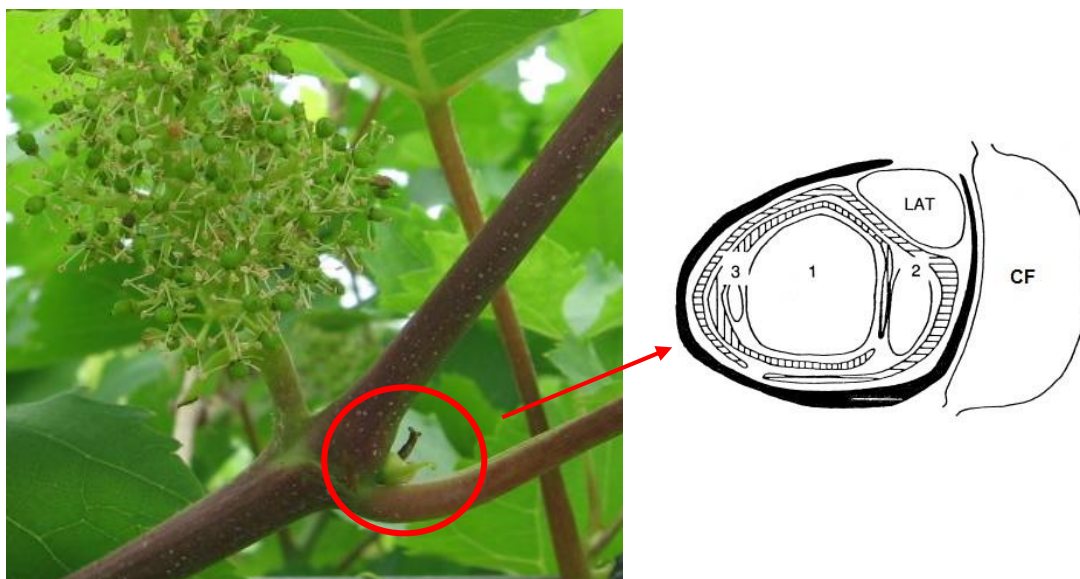


Figura 1 – Detalhes da seção transversal da gema composta de videira. (CF) Cicatriz da folha, (LAT) cicatriz da brotação lateral advinda da “gema pronta”, (1) gema primária, (2) gema secundária e (3) gema terciária. Adaptado de Morrison (1991).

4.4. Dormência em gemas

A dormência das gemas é um estado característico de plantas caducifólias que lhes permite lidar com condições desfavoráveis do inverno (Sáure, 1985). A dormência é controlada geneticamente e é induzida naturalmente pelo fotoperíodo e baixas temperaturas. Seu término ocorre na primavera após as gemas terem acumulado uma certa quantidade de horas de frio (Rinne e van der Schoot, 2004). A necessidade de temperaturas abaixo de 7°C situa-se entre 50 e 400 horas, variando em função da cultivar (Souza, 1996). As variações de temperatura podem influenciar nos processos fisiológicos internos envolvidos na entrada e saída da endodormência que podem estar relacionados com fatores diversos ligados a anatomia, fisiologia ou metabolismo da planta (Bonhomme et al., 2000; Stafstrom, 2000).

Uma gema não brotada está em constante correlação com o restante da planta sofrendo, influência de regiões mais ou menos próximas a ela, fato que determina seu potencial de brotação. Desta forma, a dormência de gemas pode se estender ao longo do ano, passando por três fases: paradormência, endodormência e ecodormência (Lang, 1987).

O período dormência se inicia ao término do período de diferenciação floral. Este se desenvolve sequencialmente desde as gemas da base até os terminais do sarmento. Terminada a diferenciação de cada gema se inicia a etapa denominada de paradormência, em que grande parte das gemas (em especial as basais) embora tenham potencial para brotar, permanecem em repouso, devido principalmente à dominância exercida pela gema apical e daquelas em crescimento, sendo esta inibição denominada de longa distância (Lang, 1987).

Durante a endodormência apesar da planta não apresentar crescimento visível, as atividades metabólicas essenciais continuam a ocorrer, embora em intensidade reduzida (Petri et al., 1996). Nesse estado só haverá brotação das gemas se for cumprido um mínimo de horas de frio, permitindo passar as etapas seguintes que são: a saída da endodormência no qual as gemas vão paulatinamente recuperando de novo sua capacidade potencial de brotar e a ecodormência, na qual a ausência de desenvolvimento da gema é devido a um fator ambiental e assim que as condições ideais sejam estabelecidas, um novo fluxo de crescimento se restabelece, pois todas as condições intrínsecas à gema lhe são favoráveis e não há nenhum sinal em longa ou curta distância que a impeça de se desenvolver (Lang et al., 1987).

4.5. Modelos de regulação da dormência induzidos por fotoperíodo e temperatura

Um modelo para o processo de regulação da dormência foi proposto por Horvath (2009), onde os genes *FLOWERING LOCUS T* (FT), *CENTRORADIALIS-LIKE 1* (CENL1) e *DORMANCY ASSOCIATED MADSBOX* (DAM) desempenham papel central (Figura 2). Neste modelo, fotoperíodo curto e/ou uma breve exposição ao frio induziria a expressão dos genes DAM, os quais atuariam como repressores do gene FT. A redução da expressão de FT seria responsável pela paralisação do crescimento vegetativo e a indução da dormência. A exposição prolongada ao frio reprimiria os genes DAM por meio da remodelação da cromatina, acarretando na superação da dormência (Horvath, 2009).

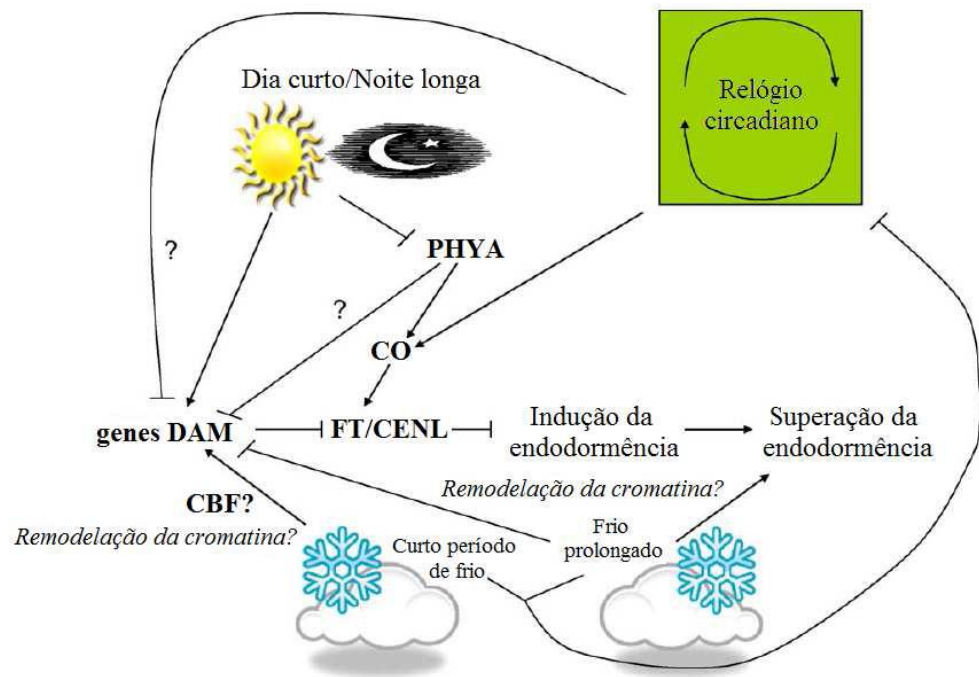


Figura 2. Modelo de indução e saída da dormência induzidos por frio e fotoperíodo. Curtos. Períodos de frio induzem os genes DAM por meio da ação dos CBFs e possivelmente por eventos de remodelação da cromatina. Alternativamente, a alteração do relógio circadiano devido à exposição a dias curtos reprime a expressão de CO, um indutor do gene FT, e induz a expressão dos genes DAM. A cascata de sinalização mediada por PHYA também é importante por integrar os sinais do relógio circadiano. A acumulação das proteínas DAM é capaz de reprimir FT. A redução de FT acarreta na paralisação do crescimento e na indução da dormência de gemas. A prolongada exposição ao frio leva à repressão dos genes DAM por meio de alterações na cromatina, além de inibir a sinalização do relógio circadiano, levando à quebra da dormência. Adaptado de Horvath (2009).

Em outro modelo a endodormência pode ser conceituada como a interrupção do desenvolvimento da sinalização do meristema apical do caule por um mecanismo inato (Rinne e van der Schoot, 1998). O estado de dormência, neste contexto, pode ser investigado a partir da perspectiva de comunicação célula-célula, sendo a endodormência o bloqueio temporário de desenvolvimento de sinalização no meristema. Portanto, o ponto crucial que determina o estado do meristema é se as células do meristema apical estão “ligadas” ou “desligadas”. Em apoio a esta hipótese, resultados encontrados em bétula (Rinne, et al., 1998, Rinne et al., 2001), mostram que durante o desenvolvimento da endodormência, corantes

fluorescentes *Lucifer Yellow* LH (Stewart, 1981) microinjetados não passavam mais de célula para célula, demonstrando que todos os plasmodesmas foram estreitados ou fechados.

A obstrução da sinalização dos canais durante endodormência não pode ser devido ao estreitamento ou fechamento de plasmodesmas por meio da ativação do mecanismo actina-miosina/centrin. Isso é óbvio, devido ao fato de que este tipo de mecanismo precisa de uma entrada contínua de energia, facilmente disponível, o que não é observado em meristemas na endodormência. A endodormência requer um fechamento semipermanente das vias de sinalização, por um mecanismo que não precisa de manutenção e de entrada de energia após a instalação, mas ainda assim, deve ser facilmente removível quando o crescimento é renovado. Tal mecanismo reversível poderia usar 1,3- β -glucano-D (calose), em um mecanismo induzido por fotoperíodo curto, que ativa a 1,3- β -D-glucano síntase, via aumento de concentração do Ca^{2+} citosólico (Rinne e van der Schoot, 2004). Um fechamento hermético das entradas, por meio da produção de 1,3- β -D-glucano (calose) nos complexos-esfíncter, bloqueia eventualmente o meristema, que fica no estado de endodormência. Em bétula, esta situação é reversível pelo retorno ao fotoperíodo longo, durante as primeiras duas semanas. Após duas semanas, o meristema implanta um estado de endodormência.

Um período adequado de refrigeração desloca os esferossomos contendo 1,3- β -D-glucanase para a adjacência da membrana plasmática e para os complexos-esfíncter. Além disso, a 1,3- β -D-glucanase livre está presente no citoplasma cortical. Posteriormente, os complexos-esfíncter desaparecem dos plasmodesmas, que retornam ao seu estado condutor. Um aumento na temperatura e subsequente disponibilidade de água amplifica a troca de sinais entre as células reacopladas para dar origem à atividade de organização do estado “ligado” (Figura 3) (Rinne e van der Schoot, 2004).

Vergara e Pérez (2010) não observaram alteração nos transcritos da 1,3- β -D-glucanase com tratamentos de baixa temperatura, porém a aplicação de compostos de quebra de dormência (cianamida hidrogenada e azida de sódio) induziu a expressão de Vv β GLU22 e Vv β GLU78 em gemas endodormentes de *Vitis* cv. Thompson Seedless.

Segundo Rinne et al. (2004) evidências comparativas, usando sistemas diferentes de plantas, sugerem que o bloqueio reversível da comunicação célula-

célula pode ser central para o ciclo de dormência em geral. Com base neste modelo, uma rede de ciclo de dormência, retrata o meristema em transição, através de três estados de comunicação celular subsequentes, com os fatores ambientais desencadeando a transição de um estado para outro (Figura 3).

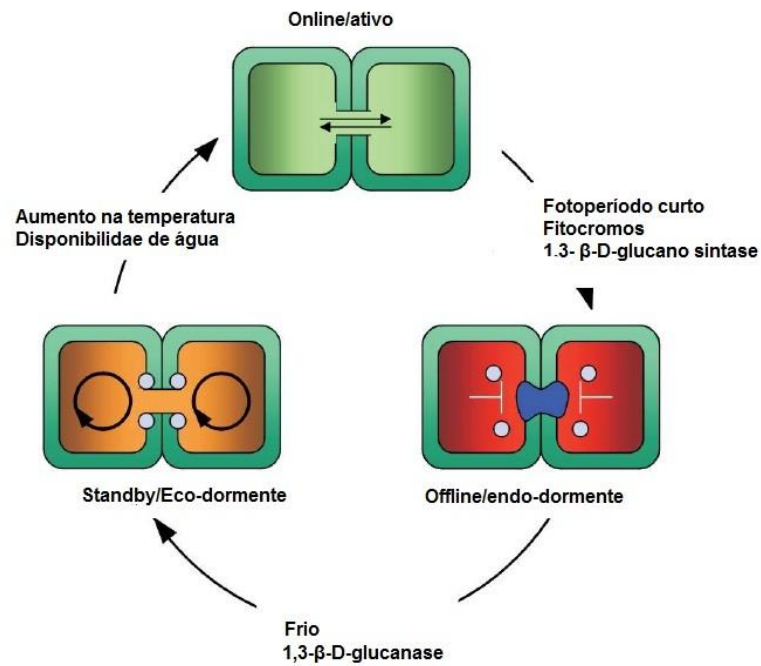


Figura 3. Modelo de rede de ciclo de dormência. Adaptado de Rinne et al. (2004).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Experimento 1: Influência do fotoperíodo sobre a aclimação em gemas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' cultivada em região tropical

5.1.1. Material vegetal e localização

As avaliações foram realizadas em plantas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' sob porta-enxerto IAC 572, crescidas em casa de vegetação na Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), localizada em Mossoró, RN (5°12'16"S de latitude). As temperaturas médias observadas no ano de 2013 e as variações de fotoperíodo nesse período estão apresentadas na figura 4.

O clima deste local é classificado segundo Köppen como BSw_h, caracterizado como, seco e muito quente, com duas estações climáticas: uma seca que vai geralmente de junho a janeiro, e uma chuvosa, de fevereiro a maio (Carmo Filho e Oliveira, 1989).

As plantas foram plantadas em vasos de 5 litros, com substrato composto por solo, areia e esterco 01:01:01 (v:v:v). Foi conduzido apenas um ramo por planta e retiradas suas inflorescências. Estas foram cultivadas em casa de vegetação a 31/29°C de temperatura e 63/79% de umidade relativa. Os dados de temperatura e umidades foram obtidos por meio de sensores automáticos *Datalogger WatchDog*® instalados em cada tratamento e programados para coletar dados em intervalos de 30 min. A luminosidade de dentro da casa de vegetação variou entre

600-1400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. de fluxo de fótons fotossintéticos (PPF), durante os meses de outubro a dezembro de 2013.

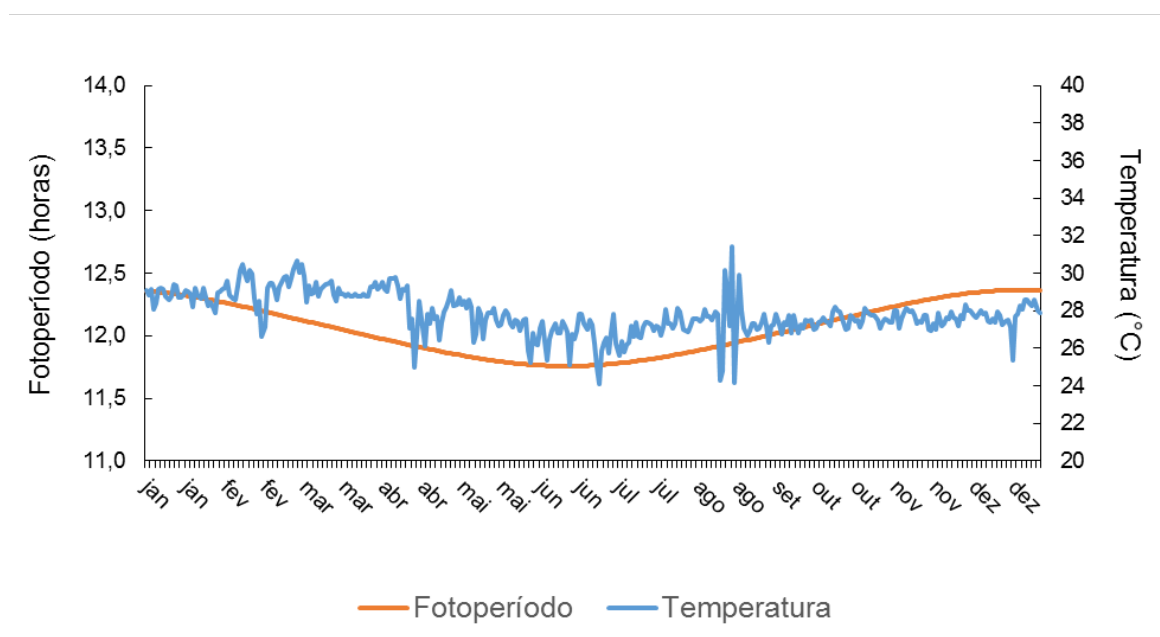


Figura 4: Temperaturas médias diárias e Fotoperíodo registrados na Estação Meteorológica instalada na Fazenda Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), distrito de Alagoinha, Mossoró, RN, para o período de janeiro a dezembro de 2013.

5.1.2. Tratamentos de fotoperíodo

Os tratamentos de fotoperíodo foram iniciados em 15 de outubro de 2013, em plantas de 50 dias após a enxertia, contendo de 12 a 16 folhas (Figura 5B), condição em que se encontravam na fase de desenvolvimento EI17 ou EL19 (Lorenz e Eichhorn, 1977). Nesta data foram selecionadas aleatoriamente quarenta plantas para cada tratamento, a qual foram submetidas a estes durante o período de 8 semanas.

Os tratamentos de fotoperíodo foram:

- Fotoperíodo Natural – Controle - (Condição natural de fotoperíodo local com 12 horas de luz);
- Fotoperíodo Longo (FL) – (Controle com o acréscimo de duas horas de iluminação artificial para se obter um fotoperíodo de 14 horas de luz). A luz suplementar foi fornecida automaticamente às 17:30 h, por lâmpadas fluorescentes de 100 W ($600 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons fotossintéticos - PPF), que foram instaladas abaixo de uma estrutura construída com

blackout de PVC dupla face branco/cinza (Figura 5C). Tal estrutura impediu que a luz atingisse os outros tratamentos;

- Fotoperíodo Curto (FC) - (Controle com menos duas horas de iluminação para se obter um fotoperíodo de 10 horas de luz). A restrição de luz foi imposta às 04:30 h com a utilização de *blackout* de PVC dupla face branco/cinza (Figura 5A).

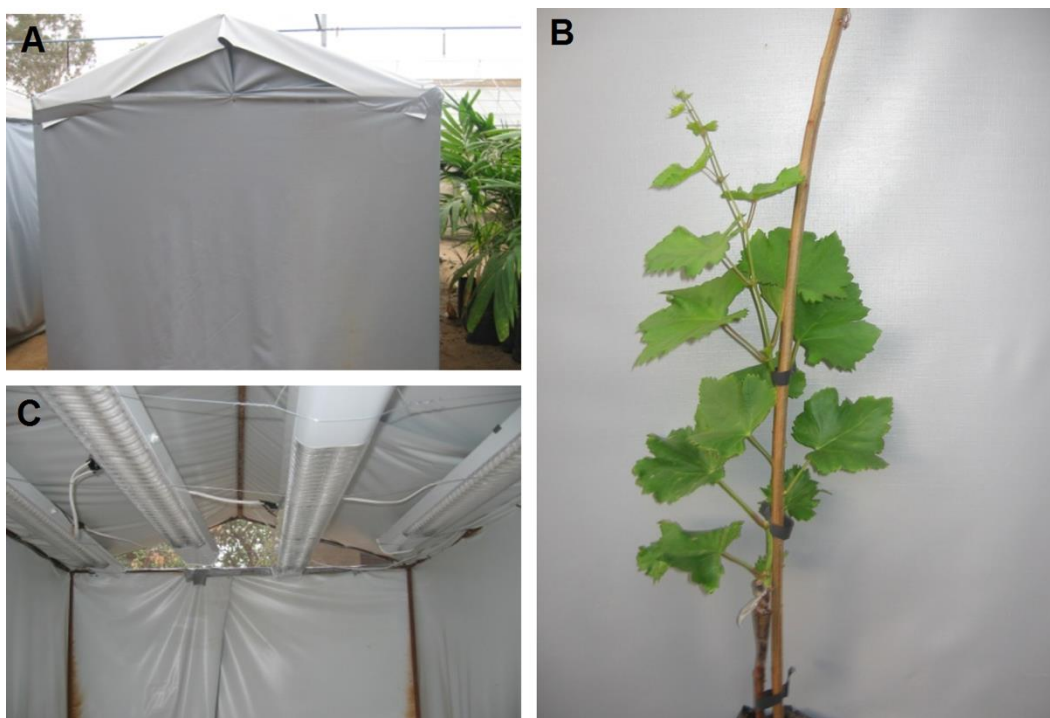


Figura 5. A) Estrutura de plástico opaco utilizada no tratamento FC para impedir a incidência de radiação solar sobre as plantas; B) Plantas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' sob porta-enxerto IAC 572 no estágio de desenvolvimento EI17 ou EL19 (Lorenz e Eichhorn, 1995); C) Estrutura de plástico opaco com iluminação artificial utilizada no tratamento FL.

5.1.3. Delineamento experimental

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, em esquema Fatorial (3 x 9), com três tratamentos: Controle (12 horas de luz), FC (10 horas de luz), FL (14 horas de luz) e nove tempos de permanência ao quais as plantas foram submetidas aos tratamentos, que variou de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 semanas. O número de repetições variou de acordo com o tipo de característica avaliada, em virtude da limitação de espaço dentro da casa de vegetação, limitando consequentemente o número de plantas por repetição das análises destrutivas. Pelo mesmo motivo as

análises destrutivas só foram realizadas a cada duas semanas. Dessa forma, estabeleceram-se 10 repetições para as medidas de crescimento de ramos, números de entrenós com desenvolvimento de periderme, conteúdo relativo de água em tecidos dos nós e abundância de transcritos e três repetições para as análises de microscopia. Os valores de desenvolvimento da periderme nos entrenós, devido ao excesso de zeros, foram transformados a fim de obter a distribuição normal dos dados.

5.1.4. Avaliações realizadas no experimento

A aclimação da variedade em resposta ao fotoperíodo foi avaliada por meio da alteração no comprimento do ramo e número de nós, conteúdo relativo de água nos tecidos dos nós, desenvolvimento de periderme nos ramos, pelo espessamento de parede celular nas células dos meristemas axilares e pelas alterações dos transcritos de VvPHYA, VvPHYB e VvFT em folhas e em gemas axilares.

5.1.4.1. Acompanhamento do desenvolvimento da periderme no ramo

O desenvolvimento da periderme foi determinado como descrito por Fennell e Hoover (1991), estimado visualmente, por monitoramento da progressão do escurecimento externo do ramo. Sendo assim, foi feita a contagem do número de entrenós marrons a partir da base para o ápice do ramo.

5.1.4.2. Crescimento dos ramos e número de nós

O crescimento foi acompanhado por meio de medições do ramo com fita métrica e contagem de números de nós, sendo os dados coletados a cada semana, durante oito semanas de tratamento.

5.1.4.3. Conteúdo relativo de água nos tecidos dos nós

O conteúdo relativo de água foi determinado como descrito por Boone (1996) em tecidos dos nós, que compreende as gemas e os tecidos adjacentes a elas. Em

cada ramo amostrado foi excisado o quinto nó acima da gema basal. A coleta foi feita a cada 2 semanas até a oitava semana em cada tratamento (Controle, Fotoperíodo Curto e Fotoperíodo Longo). Após excisados foram determinadas as massas frescas em balança digital de precisão, colocando cada nó em envelope de papel identificado que foi posteriormente pesado (envelope + amostra). As amostras foram então removidas dos envelopes e colocadas em tubos Falcon rotulados contendo 15 ml de água. Após 24 horas as amostras foram removidas e transferidas para papel toalha para remover o excesso de água na superfície. As amostras foram então recolocadas em seus respectivos envelopes e pesadas para determinar a massa saturada. Depois de anotada a massa saturada, os envelopes contendo as amostras foram colocados em estufa a 70°C por 48 horas, após o qual foi determinada a massa seca.

O conteúdo relativo de água foi determinado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Teor relativo de água} = [(MF - MS) / (MSA - MS)] \times 100$$

Na qual: MF, MSA e MS, são respectivamente, massa fresca, massa saturada e massa seca.

5.1.4.4. Abundância relativa de transcrição de genes relacionados à indução de dormência

As análises de extração, purificação e quantificação de RNA dos transcritos de PHYA, PHYB E FT de folhas e gemas coletadas em Mossoró, RN no dia 20 de dezembro de 2014, foram realizadas na Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Bioquímica Vegetal, Santiago, Chile em janeiro de 2015.

5.1.4.4.1. Coleta, processamento e armazenamento do material vegetal

Para verificar expressão diária de transcritos de VvPHYA, VvPHYB e VvFT, foram coletadas folhas expandidas e gemas posicionadas entre o 6° e 10° nó ao final de oito semanas de tratamentos. As coletas foram realizadas em cinco horários durante o dia: às 06:00 h, 10:00 h, 14:00 h, 18:00 h e 22:00 h. As amostras de

gemas e folhas, foram recolhidas e imediatamente mergulhadas em N₂ líquido e em seguida armazenadas a -80°C até a finalização da coleta. Posteriormente as amostras congeladas foram liofilizadas para extração de RNA.

5.1.4.4.2. Extração e purificação de RNA e DNAC

O RNA total foi isolado a partir das folhas e gemas liofilizadas coletadas em Mossoró, RN. Foram utilizados 0,006 g de material liofilizado para cada tratamento, que equivale a 0,5g de massa fresca, que é a quantidade utilizada pela modificação do método de Chang et al., (1993).

As amostras foram trituradas em N₂ líquido e homogeneizadas em 9 ml de tampão CTAB (CTAB a 2%, Tris-HCl 25 mM, EDTA 2 mM, NaCl 2 M e PVPP 2%). Após a adição de tampão foi adicionado imediatamente 2% de β-mercaptoetanol ao homogeneizado. O homogeneizado foi vigorosamente agitado em vortex e levado ao banho-maria a 65°C por 30 minutos, retirando e agitando no vortex a cada 10 minutos. Após esse tempo, o homogeneizado foi filtrado por meio de lã de vidro e centrifugado a 600g por 3 minutos. Foram feitas duas extrações no filtrado, adicionando a cada extração 1 volume de CHCl₃: álcool isoamílico (24:1, v/v) e centrifugando a 4000g por 5 minutos.

A fase aquosa foi precipitada durante a noite com EtOH absoluto (2,5 volumes). O RNA foi recuperado por centrifugação (6000g x 3 minutos) e lavado com EtOH 70% (7:3 v:v). Após eliminação do solvente o RNA foi seco à temperatura ambiente por 60 minutos e decorrido o tempo de secagem adicionou-se 500 ml de H₂O DEPC para a ressuspensão do RNA. A absorbância foi medida a 250 nm, usando 10 µL do extrato em 990 µL de H₂O.

Para eliminar DNA a solução de RNA foi incubada com DNase (1U/µL), para cada 10 µg de RNA utilizou-se 10U de enzima (Invitrogen, CA, EUA), a 37°C, durante 30 minutos. Para desativar a DNase foi adicionado ao tubo de PCR 15µL de EDTA 25 mM a 65°C por 10 minutos.

O RNA foi purificado por ligação à sílica (1 vol de NaI 6M e 0,5 vol de sílica). Centrifugou-se a 3000 g por 1 minuto e eliminando-se o sobrenadante. A sílica foi lavada três vezes com 500 µL tampão de lavagem (Tris-HCl 10 mM; NaCl 50 mM, EDTA 2,5 mM e EtOH 50% v/v, pH 7,5) e centrifugada a cada lavagem para eliminar o sobrenadante.

O sedimento foi seco à temperatura ambiente por 60 minutos e ressuspensão em 70 µL de H₂O DEPC, com a solução aquosa, separada por centrifugação a 13000g por 4 minutos, contendo o RNA purificado. O purificado foi quantificado no Fluorímetro Qubit 2.0. a 260 nm.

5.1.4.4.3. PCR Quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

As RT-qPCRs foram realizadas no equipamento Eco Real-Time PCR system (Illumina, Inc. SD, USA), utilizando-se a quantificação por fluorescência, usando a intercalação de SYBR-Green I como repórter fluorescente e Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA). Os primers adequados para a amplificação de produtos de 100-150 pb para cada gene em estudo foram projetados usando o Software PRIMER3 (Rozen e Skaletsky 2000) e estão apresentados na Tabela 1. Os primers específicos para VvPHYA e VvPHYB são descritos em Kühn et al., (2009) e as sequências de VvFT foram obtidas a partir de bases de dados públicos e usados WEB-Blat para pesquisar o genoma de *Vitis vinifera* na base de dados GENOSCOPE (NCBI adesão No: DQ504308).

Tabela 1. Primer relativos a VvFT, VvPHYA e VvPHYB utilizados nos experimentos de qPCR.

<i>Gene</i>	<i>Locus (GENOSCOPE)</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
VvFT	GSVIVT00012870001	5'ACATTGGAGGGGATGACTTG3	5'ATTGCGGATTATGCTTCACC3'
VvPHYA	GSVIVT00022486001	5'AGCTTGGAAGGCTTTGTGA3'	5'TGACATGGATGGCAAACACT3'
VvPHYB	GSVIVT00033144001	5'CTCATTAGCGATGGCTGTCA3'	5'TGGGACCGAAACCAGAATAG3'

Cada amostra biológica (n=2) foi analisada em quadruplicata. A amplificação de cDNA foi realizada sob as seguintes condições: 2 minutos de desnaturação a 94°C; 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. A indução ou repressão da expressão gênica foi calculada pelo Método DDCq (Livak e Schmittgen, 2001) usando VvUBIQUITINA como gen de referência. O VvUBIQUITINA foi selecionado como gene de referência porque seu nível de transcrição foi estável em todos os tratamentos.

5.1.4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As gemas axilares localizadas no terceiro nó dos ramos foram coletadas de plantas no início e após 8 semanas de tratamentos fotoperiódicos. Foram coletadas três repetições de cada tratamento. Estas gemas foram fixadas em tampão fosfato 100 mM (pH 7,2) e 2% glutaraldeído (v : v).

As amostras foram pós-fixadas em excesso de OsO₄ durante 1 hora. Depois da pós-fixação, as amostras foram lavadas duas vezes em tampão fosfato contendo 2% antimonato de potássio, em seguida lavadas duas vezes com água destilada pH 10 ajustada com KOH. Depois disso, as amostras foram desidratadas em etanol e embebidas em resina LR White (Agar Scientific, Stansted Essex, UK). As amostras emblocadas foram cortadas em seções de 90 nm por um ultramicrotomo MT4000.

As seções foram então recolhidas em grades de cobre e coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo, colocando-se as grades em uma solução aquosa de acetato de uranila 2,5% durante 20 minutos, protegidas da luz. Estas foram lavadas em água destilada e colocadas em papel filtro. Após a lavagem foram incubadas em placa de Petri com parafilme, onde foram colocadas gotas de citrato de chumbo, uma para cada grade, junto com pastilhas de hidróxido de sódio (NaOH) para diminuir a concentração de CO₂, durante 3 minutos, lavando-as após com água destilada e secando-as em seguida com filtro de papel.

Após o contraste as placas foram observadas em um MET (Microscópio Eletrônico de Transmissão) operado a 80 kV no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

5.2. Experimento 2 - Fenologia e produção de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' cultivada em região tropical de baixa latitude

5.2.1. Caracterização da área experimental

O experimento foi instalado na Fazenda Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semiárido - UFERSA (Figura 6), localizada no distrito de Alagoinha, distante 20 km da sede do município de Mossoró, RN a 5° 11' S e 37° 20' W de latitude e 18 m de altitude (Figuras 7A e 7B), em solo classificado como Latossolo Vermelho Amarelo Argissólico franco arenoso.



Figura 6. Experimento instalado na Fazenda Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), distrito de Alagoinha, Mossoró, RN.

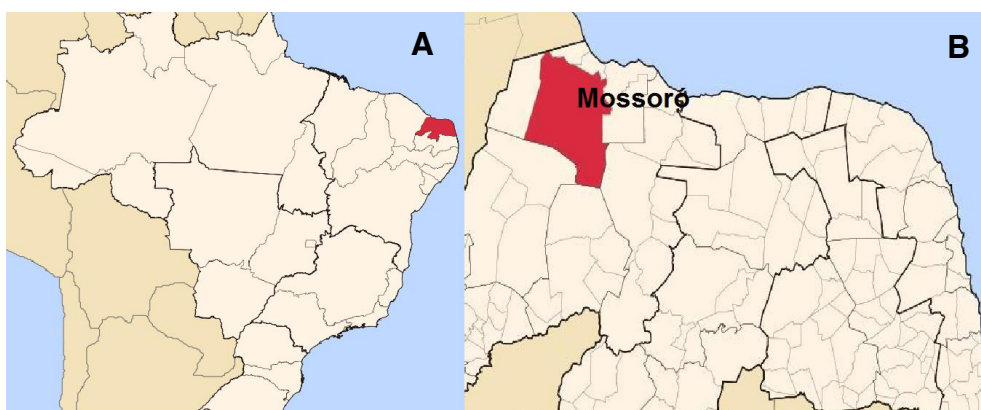


Figura 7. A) Localização do Estado do Rio Grande do Norte; B) Localização do município de Mossoró (RN) onde está localizada a área experimental.

De acordo com Carmo Filho e Oliveira, (1995) e segundo a classificação climática de Köppen, o clima de Mossoró é do tipo BSw^h, isto é, semiárido muito quente e com estação chuvosa no verão atrasando-se para o outono, apresentando temperatura média de 27,4°C, com precipitação pluviométrica anual muito irregular e com umidade relativa média do ar de 68,9%.

O sistema de condução utilizado foi em Y aberto (“wide Y”), no espaçamento de 3m x 2 m, com sistema de irrigação por aspersão.

Para uniformizar as brotações, logo após a poda, foi aplicada nas gemas uma solução de cianamida hidrogenada (Dormex®) à 5% (v/v). A poda de produção

do primeiro ciclo avaliado ocorreu em 19/04/2013 e do segundo ciclo em 25/09/2013.

5.2.2. Material vegetal

As avaliações foram realizadas em plantas da variedade Itália Melhorada, plantadas em fevereiro de 2011, por meio de mudas produzidas por enxertia de mesa tendo como porta-enxertos as cultivares IAC 313 'Tropical', IAC 572 'Jales' e IAC 766 'Campinas'.

A cultivar de copa 'Itália Melhorada, parece ser um clone de 'Itália' também chamada de 'Itália Muscat', ou ainda mutação natural identificada em um vinhedo comercial da região de Petrolina (Leão, 2010). Embora essa autora afirme que ela se destaca pelo maior peso e tamanho de bagas, maior peso de cachos e sabor moscatel mais acentuado, Estigarribia Borges et al. (2008), em comparação direta, afirmaram que a variedade Itália Melhorada é semelhante à Itália em características qualitativas e quantitativas, acrescentando que não há documentação científica que comprove a origem daquela variedade.

Os porta-enxertos utilizados:

- IAC 313 'Tropical' - Cruzamento do porta-enxerto Golia com a espécie de videira tropical *Vitis cinerea* realizado por Santos Neto. Vigoroso. Apresenta perfeita adaptação às condições climáticas paulistas, adaptando-se bem a diferentes tipos de solo, inclusive os que apresentam acidez elevada. Suas folhas apresentam boa resistência às moléstias. As estacas apresentam bom índice de pegamento, devendo ser evitadas, no entanto, aquelas com diâmetro superior a um centímetro. É bom porta-enxerto para diversos cultivares. Vem sendo usado no Vale do Rio São Francisco, tendo sido nessa região, por muito tempo, praticamente o único porta-enxerto, ao lado do IAC 572, com o qual é confundido na prática (Pommer, 2003);
- IAC 572 'Jales' - obtido por um cruzamento entre *Vitis caribae* x 101-14 Mgt, vem sendo utilizado em todo o Estado de São Paulo e no Vale do São Francisco. É vigoroso, desenvolvendo-se bem em solos argilosos e arenosos. Resistente a moléstias, com ramos de lignificação tardia e dificilmente perde as folhas. Possui ótimo enraizamento e pegamento (Pommer, 2003);

- IAC 766 'Campinas' - cruzamento do porta-enxerto Ripária do Traviú com a espécie de videira tropical *Vitis caribaea* realizado por Santos Neto, em 1958, é medianamente vigoroso. Pela sua versatilidade, apresenta boa adaptação às diversas condições brasileiras. Suas folhas são bastante resistentes às doenças e seus ramos hibernam melhor que os do porta-enxerto Tropical. Suas estacas apresentam bom índice de pegamento. Graças à plasticidade de seu vigor, tem sido um dos porta-enxertos mais escolhidos para plantios de variedades apirênicas no Vale do Submédio São Francisco.

5.2.3. Delineamento Experimental

Utilizou-se delineamento em DBC com parcela subdividida no tempo, em esquema (6x3x2) seis blocos, três porta-enxertos e dois ciclos.

5.2.4. Avaliações realizadas no experimento

5.2.4.1. Fenologia do ciclo de produção (Poda-Colheita)

O comportamento fenológico do ciclo de produção da videira foi determinado no período entre a poda e a colheita, por meio de observações visuais, realizando duas avaliações semanais a partir da poda até a floração e, posteriormente, uma avaliação semanal até a colheita. A caracterização fenológica foi realizada em 3 plantas por parcela, que foram aleatoriamente selecionadas dentro de cada tratamento, sendo etiquetados 4 ramos em cada planta, os quais foram utilizados para as avaliações seguindo a escala fenológica do sistema de Lorenz e Eichhorn modificado por Coombe (1995) (Figura 8), registrando em dias a duração das seguintes fases:

a) *Poda a brotação (E1)*: quando 50% das gemas atingiram o estágio de ponta verde (EL04), ou seja, exposição dos tecidos foliares;

b) *Brotação à floração (E2)*: quando 50% das inflorescências atingiram 80% de abertura das flores (EL25);

c) *Floração à frutificação (E3)*: quando 50% dos cachos iniciaram o pegamento dos frutos (EL27), ou seja, frutos jovens em crescimento apresentando diâmetro maior que 2 mm;

d) *Frutificação à maturação (E4)*: quando 50% dos cachos iniciaram o amolecimento das bagas (EL34);

g) *Maturação à colheita (E5)*: quando 50% dos cachos alcançaram o ponto de colheita (EL38), apresentando teor de sólidos solúveis igual ou superior a 14° Brix.

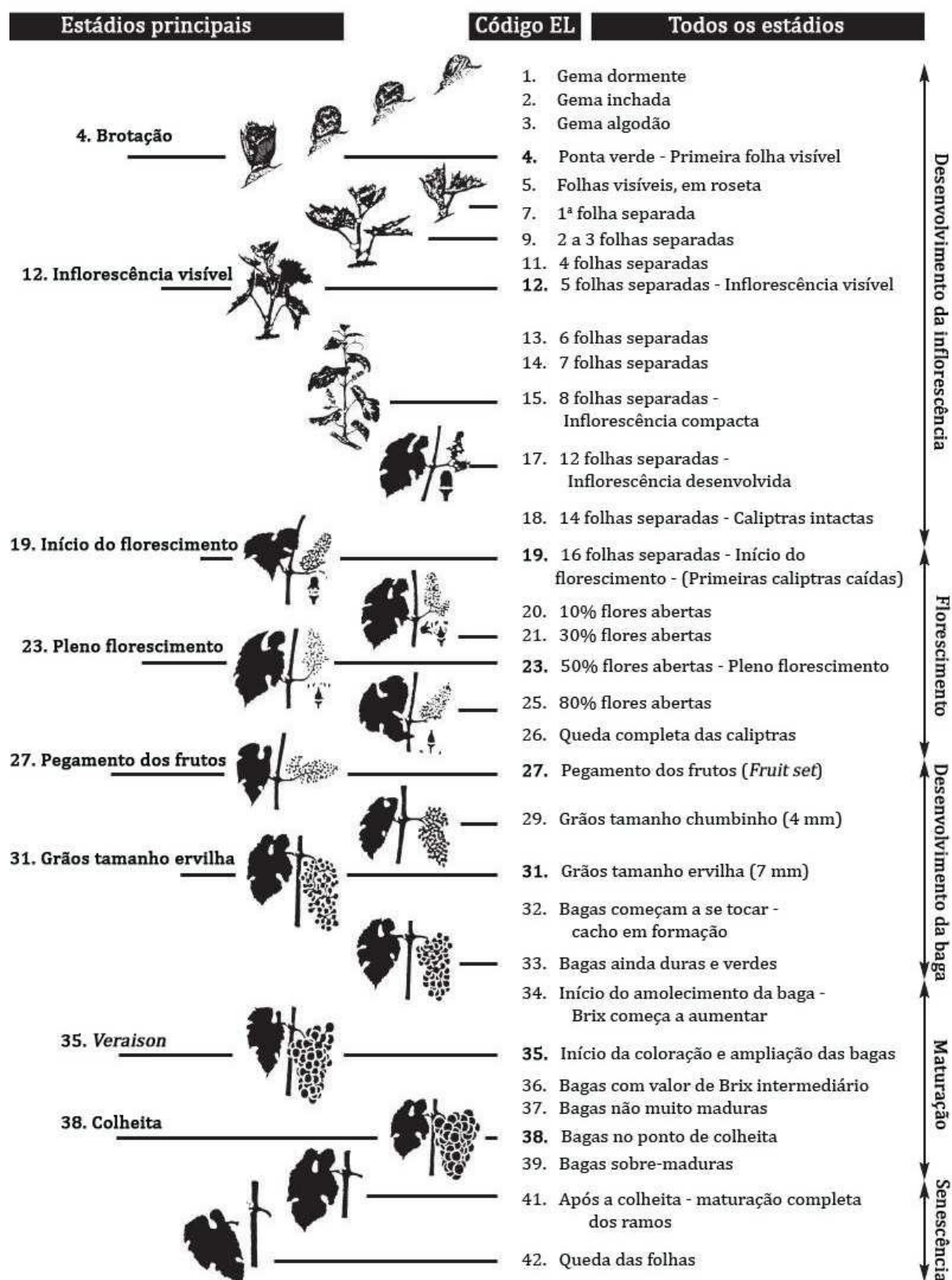


Figura 8. Estádios fenológicos da videira de acordo com Eichhorn e Lorenz modificado por Coombe (1995). Adaptado por Stofel (2012).

5.2.4.2. Caracterização qualitativa das bagas

Foram coletados aleatoriamente, durante a colheita, cinco cachos por parcela, os quais foram utilizados para caracterização qualitativa da colheita nos diferentes ciclos.

5.2.4.3. Peso médio das bagas

A determinação do peso médio das bagas foi realizada em cinco cachos. Foram amostradas dez bagas de cada cacho tomando-se o cuidado de coletar amostras em diferentes posições dos cachos. As bagas amostradas foram pesadas e sua massa dividida pelo número de bagas.

5.2.4.4. Sólidos solúveis totais (°Brix)

O teor de sólidos solúveis foi obtido por refratometria, utilizando refratômetro portátil ATAGO N1, com leitura na faixa de 0 a 32°Brix. As leituras foram feitas em amostras do suco de dez bagas.

5.2.4.5. Acidez total titulável (% ácido tartárico)

Para a determinação da acidez titulável foi extraído o suco de dez bagas. Deste, uma alíquota de 5 mL foi transferida para becker contendo cerca de 50 mL de água deionizada. À amostra adicionaram-se três gotas de indicador de fenolftaleína 1%, procedendo-se em seguida a titulação, sob agitação, com solução da NaOH 0,1 N, previamente padronizada com biftalato de potássio até a virada da cor da amostra. Os resultados foram expressos em g equivalente de ácido tartárico (100 g de polpa)⁻¹, após aplicação da seguinte equação:

$$\text{g equivalente de ácido tartárico (100 g de polpa)}^{-1} = (V \times f \times N \times PE \times 100) \div P$$

na qual:

V = volume de NaOH 0,1 N gasto na titulação;

f = fator de correção devido à padronização, que é de 0,94;

N = normalidade do NaOH (eqL^{-1});

PE = peso equivalente do ácido tartárico (g eq^{-1}); e

P = massa de polpa (g).

5.2.4.6. Relação entre sólidos solúveis totais e acidez titulável

A relação entre sólidos solúveis totais e acidez total titulável foi obtida pela divisão do teor de sólidos solúveis totais pela acidez total titulável. Os resultados foram expressos por meio dos valores absolutos encontrados.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento 1 - Influência do fotoperíodo sobre a aclimação em gemas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' cultivada em região tropical

O resumo da análise de variância para o comprimento de ramo e número de nós está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as variáveis número de nós (unidades) e comprimento do ramo (cm) de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliadas sob três regimes fotoperiódicos: Controle (Fotoperíodo Natural): 12 horas de luz; FC (Fotoperíodo curto) = 10 horas de luz e FL (Fotoperíodo longo): 14 horas de luz, durante oito semanas.

FV	GL	F (Parâmetros avaliados)	
		NN	CR
Fotoperíodo (A)	2	46,55**	3,04*
Tempo (B)	8	481,00**	1266,58 **
Fotoperíodo x Tempo (AxB)	16	0,8509 ^{ns}	0,33*
QMA		200,95	355,40
QMB		2076,39	148062,01
QMAxB		3,67	38,71
QMRÉSIDUO		4,32	116,89
CV(%)		7,63	7,30

CC: Comprimento do ramo; NN: Número de nós. **, *: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F de Snedecor; ^{ns}: não significativo.

Os tratamentos FC e Controle não diferiram estatisticamente entre si quanto ao número de nós, enquanto o FL apresentou uma média superior a estes tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Médias de número de nós (unidades) de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliadas sob três regimes fotoperiódicos, durante oito semanas.

Tratamentos	Médias
Controle	26,52 b
FC	26,24 b
FL	28,95 a

Controle (Fotoperíodo natural): 12 horas de luz; FC (Fotoperíodo curto): 10 horas de luz e FL (Fotoperíodo longo): 14 horas de luz. Médias seguidas pela mesma não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$); $n=10$.

As plantas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' cultivadas sob fotoperíodo Controle, FC e FL não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao comprimento do ramo durante o período de avaliação (Tabela 4). Atingindo um comprimento médio de ramo de 236,9 cm ao fim de oito semanas.

Tabela 4. Médias de comprimento do ramo em *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliadas sob três regimes fotoperiódicos, durante oito semanas.

Tratamento	Comprimento do ramo (cm) durante oito semanas								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Controle	47,3 ±1,1 aH	64,1± 1,3 Ag	94,8 ± 1,1 aF	127,2 ± 1,2 aE	158,9 ±1,3 aD	185,2 ±1,4 aC	209,9 ±1,4 aB	221,4 ±1,5 aB	237,2±1,8 aA
FC	42,4 ±2,0 aH	61,2 ±1,8 Ag	90,7 ± 2,1 aF	124,2 ± 2,4 aE	156,6 ±5,4 aD	181,8 ±6,4 aC	206,4 ±8,0 aB	217,5±8,7 aAB	231,3±8,9 aA
FL	44,3 ±1,1 al	62,2 ±1,1 Ah	94,8 ± 1,3 aG	126,6 ± 1,3 aF	156,8±1,7 aE	182,3 ±2,1 aD	205,4 ±2,2 aC	223, 8±2,2 aB	242,1±2,7 aA

Controle (Fotoperíodo natural): 12 horas de luz; FC (Fotoperíodo curto): 10 horas de luz e FL (Fotoperíodo longo): 14 horas de luz. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P<0.05$); $n=10$.

A progressão da formação de periderme nos entrenós dos ramos de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' cultivada sob diferentes tratamentos fotoperiódicos durante oito semanas está apresentada na tabela 5.

O início da formação de periderme nos ramos, ocorreu a partir da quarta semana nos tratamentos Controle e FC, não diferindo estatisticamente entre esses tratamentos até a sexta semana, na qual o tratamento FC ultrapassou o Controle em número de entrenós com periderme formada. Em ambos houve um aumento progressivo de formação de periderme até o final da oitava semana, enquanto que no LD não foi observada a formação de periderme durante todo período experimental (Tabela 5).

Tabela 5. Médias de número de entrenós com formação de periderme em *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliadas sob três regimes fotoperiódicos, durante oito semanas.

Tratamento	Número de entrenós (unid.) com periderme durante oito semanas											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8			
Controle	0 ± 0 aE	0 ± 0 aE	0 ± 0 aE	0 ± 0 aE	2,5 ± 0,8 aCD	4,2 ± 0,6 aC	5,8 ± 0,4 bC	8,2 ± 0,51 bB	11,7 ± 0,4 bA			
FC	0 ± 0 aF	0 ± 0 aF	0 ± 0 aF	0 ± 0 aF	4,5 ± 0,4 aE	6,3 ± 0,4 aD	8,9 ± 0,6 aC	12 ± 0,4 aB	15,6 ± 0,5 aA			
FL	0 ± 0 aA	0 ± 0 aA	0 ± 0 aA	0 ± 0 aA	0 ± 0 bA	0 ± 0 bA	0 ± 0 cA	0 ± 0 cA	0 ± 0 cA			

Controle (Fotoperíodo natural): 12 horas de luz; FC (Fotoperíodo curto): 10 horas de luz e FL (Fotoperíodo longo): 14 horas de luz. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$); $n = 10$.

O resumo da análise de variância na Tabela 6 demonstra que houve diferença significativa para interação Fotoperíodo x Tempo (AxB) quanto ao Conteúdo Relativo de água nos tecidos dos nós de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada sob três regimes fotoperiódicos, durante oito semanas, com coletas a cada duas semanas e suas médias estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 6. Resumo da análise de variância para a variável Conteúdo Relativo de Água (CRA) nos tecidos dos nós de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada sob três regimes fotoperiódicos, durante oito semanas.

FV	Gl	F (Parâmetro avaliado)
		CRA
Fotoperíodo (A)	2	160,81**
Tempo (B)	3	29,55**
Fotoperíodo x Tempo (AxB)	6	20,78 **
QMA		940,63
QMB		172,88
QMAxB		121,59
QMRÉSIDUO		5,84
CV(%)		2,84

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F de Snedecor.

A tabela 7 evidencia que o conteúdo relativo de água nos tecidos dos nós não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos Controle e FC em nenhum dos tempos amostrados, porém estes diferiram do tratamento FL, que dentre os tratamentos foi o que sofreu uma menor redução de água ao longo do tempo.

As reduções no conteúdo relativo de água foram evidentes a partir da segunda semana para os tratamentos Controle e FC, 9,5% e 9,7%, respectivamente. Enquanto que, no mesmo período, foi observado um aumento de 3,7% no tratamento FL. Da quarta à oitava semana não foram observadas diferenças estatísticas nas variações de conteúdo de água nos tecidos dentro de cada tratamento (Tabela 7).

Tabela 7. Médias do Conteúdo Relativo de Água nos tecidos dos nós em *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliadas sob três regimes fotoperiódicos, durante oito semanas.

Tratamentos	Conteúdo Relativo de Água (%) durante oito semanas			
	2	4	6	8
Controle	88,2 ± 0,8 aA	78,7 ± 1,5 bB	79,7 ± 0,7 bB	80,8 ± 0,6 bB
FC	89,5 ± 0,5 aA	79,8 ± 1,0 bB	80,6 ± 0,5 bB	81,4 ± 1,0 bB
FL	88,4 ± 0,6 aB	92,1 ± 0,6 aA	91,5 ± 0,3 aA	90,8 ± 0,3 aAB

Controle (Fotoperíodo natural): 12 horas de luz; FC (Fotoperíodo curto): 10 horas de luz e FL (Fotoperíodo longo): 14 horas de luz. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$); $n=10$.

Fazendo uma análise geral dentro dos tratamentos fotoperiódicos, a formação da periderme nos ramos de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' apresentou uma correlação negativa ($P < 0,01$) entre o conteúdo relativo de água nos tecidos dos nós e uma correlação positiva ($P < 0,01$) entre o comprimento dos ramos e o número de nós. O comprimento do ramo também apresentou uma correlação positiva com o número de nós e correlacionou-se negativamente com o teor de água, ou seja, à medida que o ramo crescia, devido ao alongamento dos entrenós, o conteúdo relativo de água na região dos nós diminuía enquanto a formação de periderme progredia (Tabela 8).

Tabela 8. Coeficiente de Correlação de Pearson para Conteúdo relativo de água, número de nós, comprimento do ramo e formação de periderme em *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada sob três regimes fotoperiódicos: Controle (Fotoperíodo natural): 12 horas de luz; FC (Fotoperíodo curto): 10 horas de luz e FL (Fotoperíodo longo): 14 horas de luz, durante oito semanas.

Variável	Água	Nós	Comprimento do ramo	Periderme
Água	----	- 0,0957	- 0,2586**	- 0,6068**
Número de Nós		----	0,9354**	0,4797**
Comp. do ramo			----	0,5851**
Periderme				----

**Coeficientes são significativos pelo teste "t" de Student a $P < 0,01$.

A análise das correlações dentro de cada tratamento, mostrou uma tendência similar entre as correlações nos tratamentos Controle e FC, ambos apresentaram correlações negativas entre o teor relativo de água nos tecidos dos nós e o comprimento dos ramos, número de nós e formação de periderme (Tabelas 9 e 10). Enquanto a formação da periderme apresentou uma correlação positiva com o número de nós e comprimento do ramo nos tratamentos Controle (Tabelas 9) e FC (Tabelas 10).

Tabela 9. Coeficiente de Correlação de Pearson para Conteúdo relativo de água, número de nós, comprimento do ramo e formação de periderme em *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada sob fotoperíodo Controle (Fotoperíodo natural): 12 horas de luz, durante oito semanas.

Variável	Água	Nós	Comprimento do ramo	Periderme
Água	----	- 0,4762**	- 0,5711**	- 0,3214
Nós		----	0,9176**	0,8899**
Comprimento do ramo			----	0,8793**
Periderme				----

**Coeficientes são significativos pelo teste "t" de Student a $P < 0,01$.

Tabela 10. Coeficiente de Correlação de Pearson para Conteúdo relativo de água, número de nós, comprimento do ramo e formação de periderme em *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada sob FC (Fotoperíodo curto): 10 horas de luz, durante oito semanas.

Variável	Água	Nós	Comprimento do ramo	Periderme
Água	----	- 0,5507**	- 0,5876**	- 0,5110**
Nós		----	0,9585**	0,9319**
Comprimento do ramo			----	0,9117**
Periderme				----

**Coeficientes são significativos pelo teste "t" de Student a $P < 0,01$

Esses dados confirmam o que foi observado quando se fez a análise geral de todos os tratamentos, mostrando que à medida que os ramos se desenvolvem ocorre progressão da periderme e observa-se menos conteúdos relativos de água nos tecidos dos nós. Porém, aqui podemos ver com maiores detalhes, já que o Controle e FC apresentam correlações negativas significativas para os conteúdos relativos de água nos tecidos dos nós e números dos nós, o que não foi possível

observar quando analisamos os tratamentos em conjunto. Mostrando assim, que para esses tratamentos a emissão de novos nós, além do crescimento devido ao alongamento, contribuiu negativamente para essa relação.

No tratamento FL ocorreram correlações positivas entre o comprimento ramos, número de nós e o conteúdo de água (Tabela 11). Neste caso, ao contrário do que aconteceu no Controle e FC, o conteúdo de água aumentou com o desenvolvimento do ramo.

Em condições de FL não houve correlação entre a formação da periderme e as demais variáveis analisadas, já que nesse tratamento não ocorreu formação de periderme até o término do experimento (Tabela 11).

Tabela 11. Coeficiente de Correlação de Pearson para Conteúdo relativo de água, número de nós, comprimento do ramo e formação de periderme em *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada sob FL (Fotoperíodo longo): 14 horas de luz, durante oito semanas.

Variável	Água	Nós	Comprimento do ramo	Lignificação
Água	----	0,4302**	0,4436**	0,0000
Nós		----	0,9780**	0,0000
Comprimento do ramo			----	0,0000
Lignificação				----

**Coeficientes são significativos pelo teste "t" de Student a $P < 0,01$.

As alterações citológicas nos meristemas de gemas axilares antes e após oito semanas sob os tratamentos Controle, FC e FL estão apresentadas na Figura 9. As gemas coletadas antes do início dos tratamentos fotoperiódicos (tempo zero) e, portanto, expostas apenas ao fotoperíodo natural (12 horas de luz) apresentam paredes celulares delgadas e inúmeros vacúolos pequenos (Figura 9A). O mesmo é observado nos tratamentos FL (Figura 9D) e Controle (Figura 9B) após oito semanas de tratamento fotoperiódico, não ocorrendo muitas alterações visíveis na espessura das paredes em relação ao tempo zero.

Pode observar também a presença de plasmodesmas conectando as células dos meristemas (setas vermelhas) no tempo zero (Figura 9A) e após oito semanas no Controle (Figura 9B) e em FL (Figura 9D).

Em FC pode-se perceber um visível espessamento das paredes celulares e vacúolos maiores, com muito material fenólico em seu interior e os plasmodesmas

aparentemente obstruídos por calose (Figura 9C), porém essa obstrução não foi evidenciada em todas as imagens do tratamento FC.

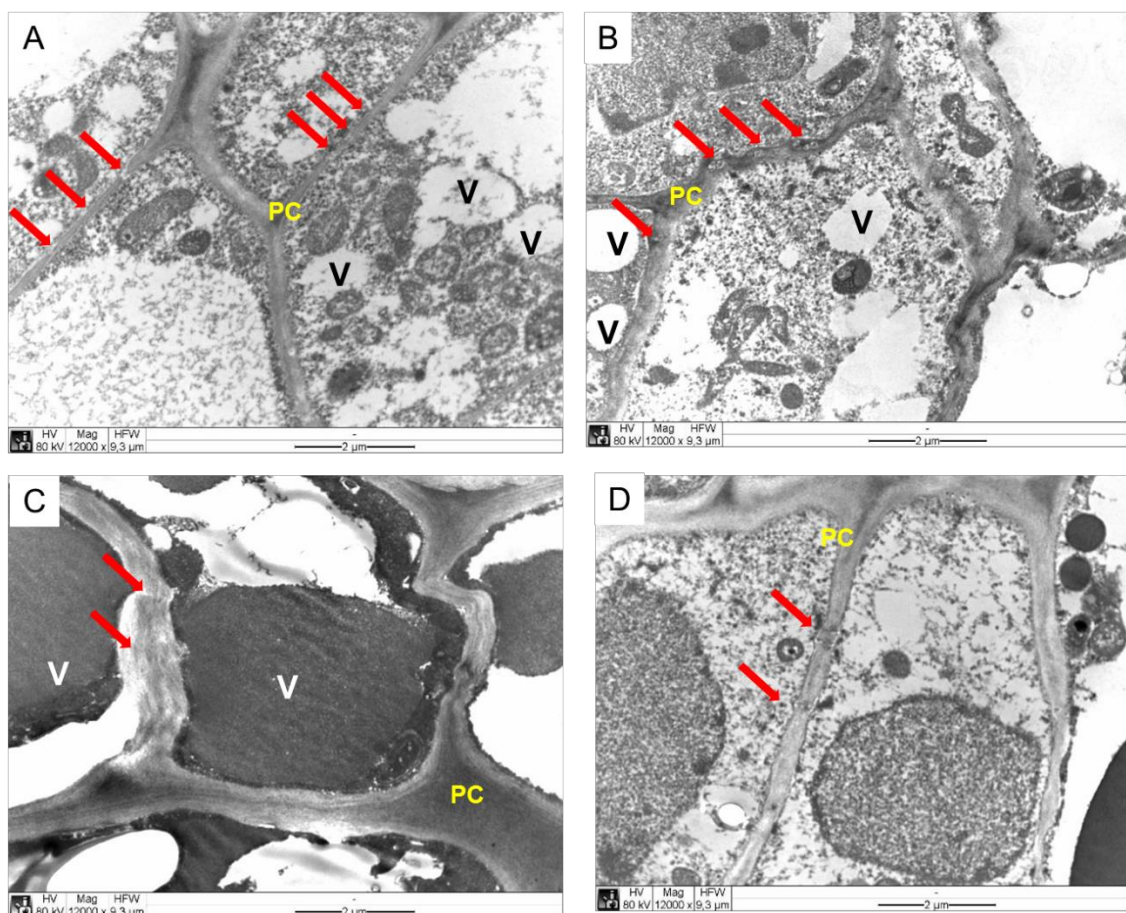


Figura 9. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células de meristemas axilares de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada'. A) Tempo zero (dia do início dos tratamentos) e após oito semanas de tratamentos: B) Fotoperíodo natural (Controle): 12 horas de luz; C) Fotoperíodo curto (FC): 10 horas de luz e D) Fotoperíodo longo (FL): 14 horas de luz. Escala das imagens: 2 µm. Aumento: 12000x. (PC) Parede celular; (V) Vacúolo; Setas vermelhas: plasmodesmas.

Imagens de MET com aumentos entre 20000x a 50000x das células dos meristemas axilares de 'Itália Melhorada' são expostas na Figura 10, a fim de visualizar com mais detalhes os plasmodesmas. Nas figuras 10A e 10D, que correspondem respectivamente, ao tempo zero (antes da imposição dos tratamentos) e ao FL (após oito semanas de tratamento), pôde ser visto conexões de plasmodesmas primários entre as células. Já nas figuras 10B e 10C, que correspondem aos tratamentos Controle e FC, após oito semanas, foi visualizado plasmodesmas secundários.

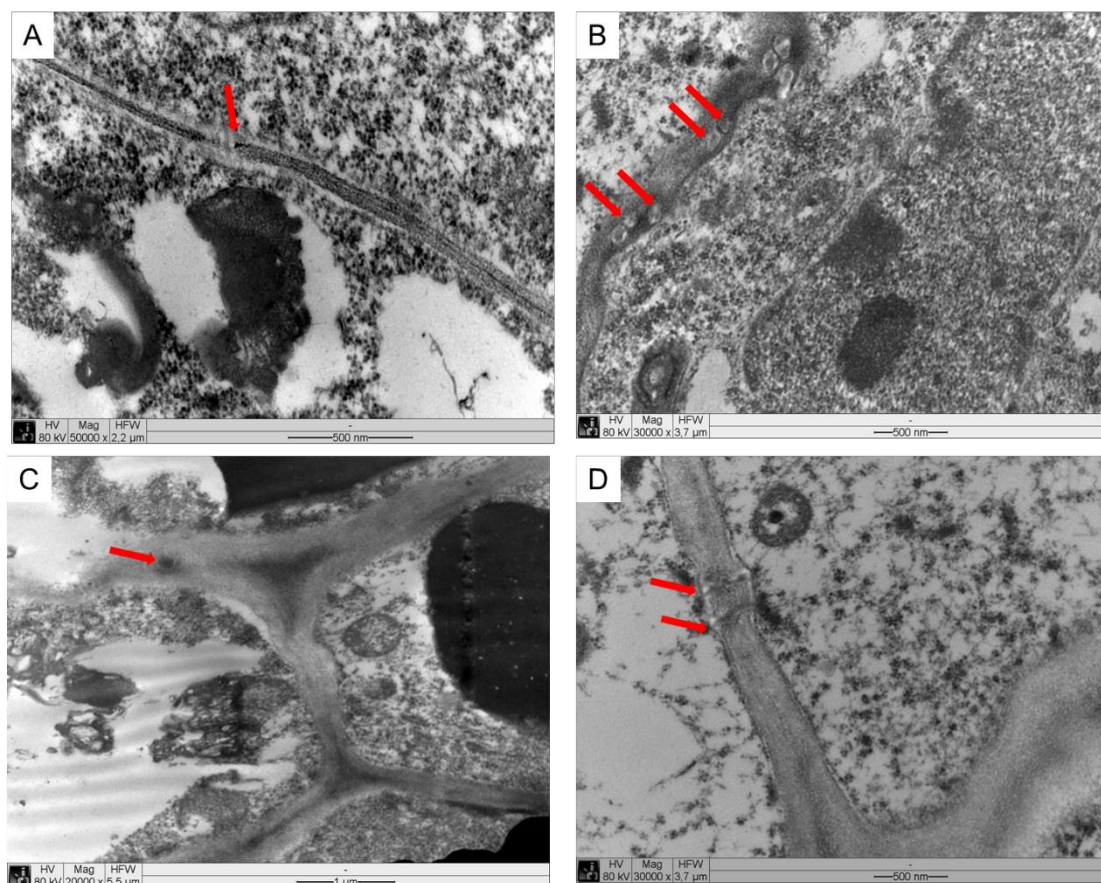


Figura 10. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células de meristemas axilares de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada'. Detalhes dos plasmodesmas: A) Tempo zero (dia do início dos tratamentos). Escala: 500nm e aumento de 50000x. Após oito semanas de tratamentos: B) Controle (Fotoperíodo natural): 12 horas de luz. Escala: 500nm e aumento de 30000x; C) Fotoperíodo curto: 10 horas de luz. Escala: 1µm e aumento de 20000x e D) Fotoperíodo longo: 14 horas de luz. Escala: 500nm e aumento de 30000x. Setas vermelhas: plasmodesmas.

As medições de espessura das paredes celulares das células dos meristemas axilares, no programa Image J (Abramoff et al., 2004), confirmaram as diferenças observadas nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão, os dados estão apresentados na Figura 11, evidenciando o maior espessamento de parede celular em FC com relação às células antes de iniciarem os tratamentos e ao Controle e FL após oito semanas.

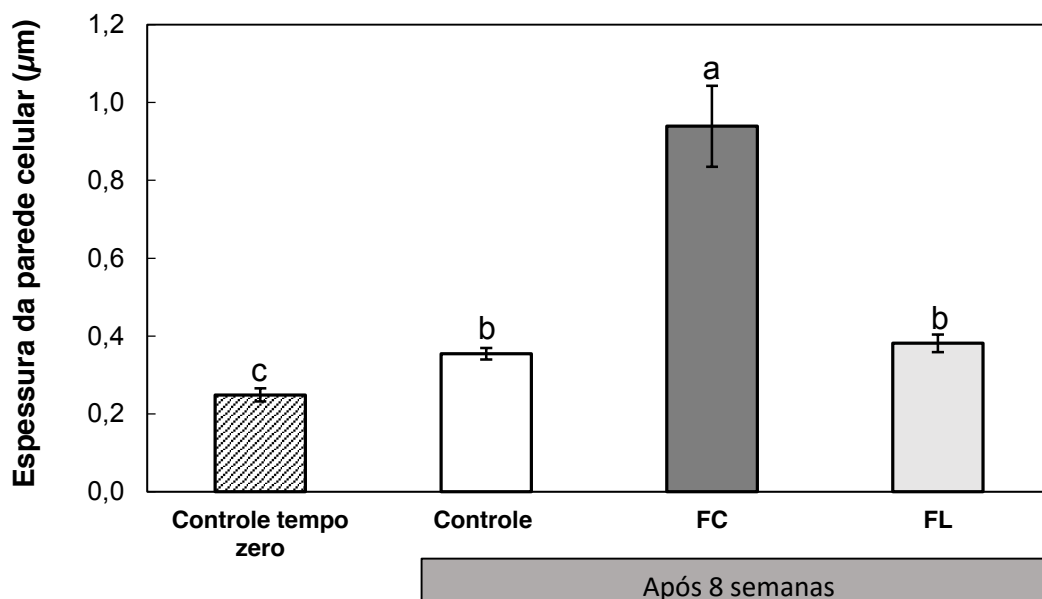


Figura 11. Espessura de parede celular de células dos meristemas axilares de *Vitis vinífera* L. 'Itália Melhorada', crescidas em casa de vegetação em Mossoró, RN (5°12'16"S de latitude), no tempo zero (dia de início dos tratamentos) e após oito semanas de tratamentos: Controle (Fotoperíodo natural): 12 horas de luz; FC (Fotoperíodo curto): 10 horas de luz e FL (Fotoperíodo longo): 14 horas de luz. Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). $N = 16$.

Os níveis de expressão do VvPHYB (Figura 12A) nas folhas de modo geral foram maiores que os de VvPHYA (Figura 12B) e apresentaram oscilação ao longo do dia com uma tendência similar ao VvPHYA. No tratamento Controle o pico de expressão foi observado às 10:00 horas, mantendo-se inalterado até às 14:00 h, chegando aos valores mínimos também às 22:00 h. Enquanto em FC houve a máxima expressão observada às 14:00 h. É importante observar que houve um deslocamento do pico máximo de quatro horas em relação ao Controle e o mínimo de expressão coincidiu com o do Controle, às 22:00 h (Figura 12A).

Em condições de FL a abundância relativa de transcritos de VvPHYB nas folhas atingiu seu nível máximo às 10:00 horas e mínimo pela manhã e novamente às 14:00 h (Figura 12A).

A abundância de transcritos de VvPHYA nas folhas de *Vitis vinífera* L. 'Itália Melhorada' oscilou com o ritmo diário. No tratamento Controle houve aumento no nível de transcritos ao amanhecer, atingindo um pico às 10:00 h e diminuindo linearmente durante o período de luz, alcançando níveis mínimos às 22:00 h.

Enquanto que em condições de FC os níveis máximos são alcançados às 14:00 h e os mínimos alcançados às 22:00 h. Esse decréscimo ocorreu de forma mais acentuada em FC com relação ao Controle e aqui similar ao que aconteceu com VvPHYB também houve um deslocamento do pico de expressão dos transcritos em FC, quando comparado ao Controle em quatro horas (Figura 12B).

Em condições de FL a abundância relativa de transcritos de VvPHYA nas folhas atingiu seu nível mínimo às 14:00 h, subiu a partir daí alcançando o nível máximo às 22:00 h (Figura 12B).

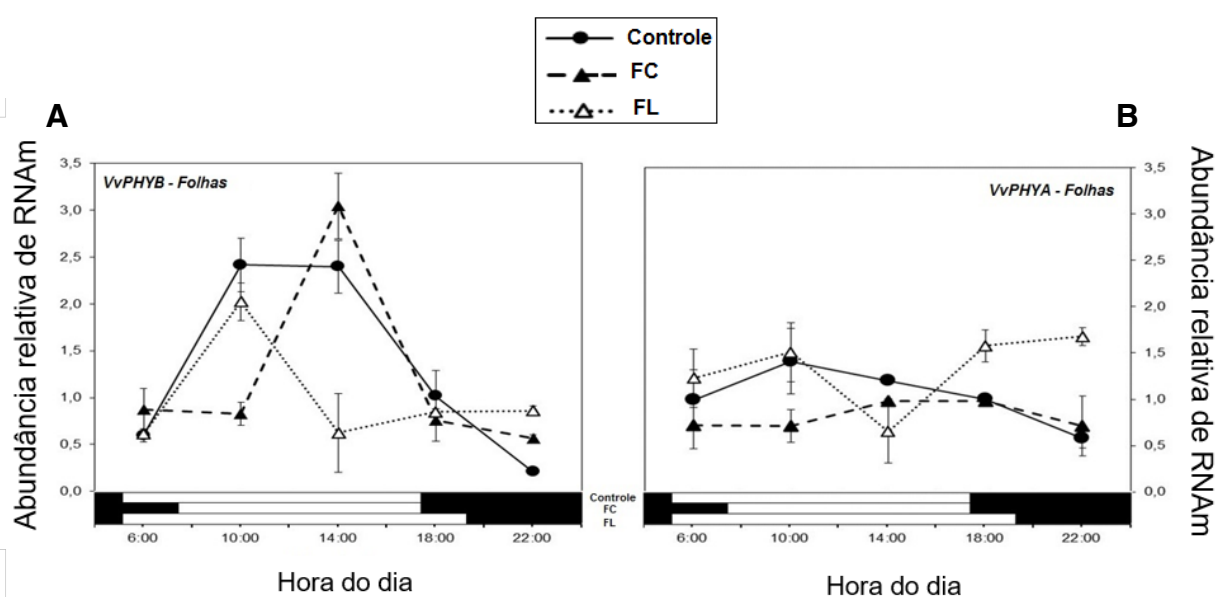


Figura 12. Padrão de expressão diária de transcritos após 8 semanas de tratamento fotoperiódico: Abundância relativa de RNAm de (A) VvPHYB e (B) VvPHYA em folhas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada', crescidas em casa de vegetação em Mossoró, RN (5°12'16"S de latitude).

Nas gemas os níveis de transcritos de VvPHYA e VvPHYB foram bem maiores do que nas folhas, porém a oscilação com o ritmo diário foi mantida, assim como ocorreu nas folhas (Figuras 12 e 13) e nas gemas, ao contrário do que foi observado nas folhas, os níveis de expressão do VvPHYB de modo geral foram menores que os de VvPHYA, apresentando oscilações ao longo do dia com uma tendência similar ao VvPHYA nos tratamentos Controle e em FL (Figura 13A e 13B). No tratamento Controle o pico máximo de expressão de VvPHYB, assim como nas folhas, também foi observado às 10:00 h, porém em FL às 14:00 h (Figura 13A). Em FC houve uma maior expressão às 6:00 h e mínima às 18 h (Figura 13A).

No tratamento Controle nível mínimo de transcritos de VvPHYA ocorreu ao amanhecer, às 06:00 h (Figura 13B). Nas gemas, ao contrário do que ocorreu nas folhas não houve deslocamento do pico máximo de transcrição em condições de FC em relação ao Controle, ambos tiveram sua expressão máxima às 10:00 h (Figura 13B).

Em condições de FL a abundância relativa de transcritos de VvPHYA nas gemas atingiu seu nível mínimo às 6:00 h, subiu a partir daí alcançando o nível máximo às 14:00 h. (Figura 13B).

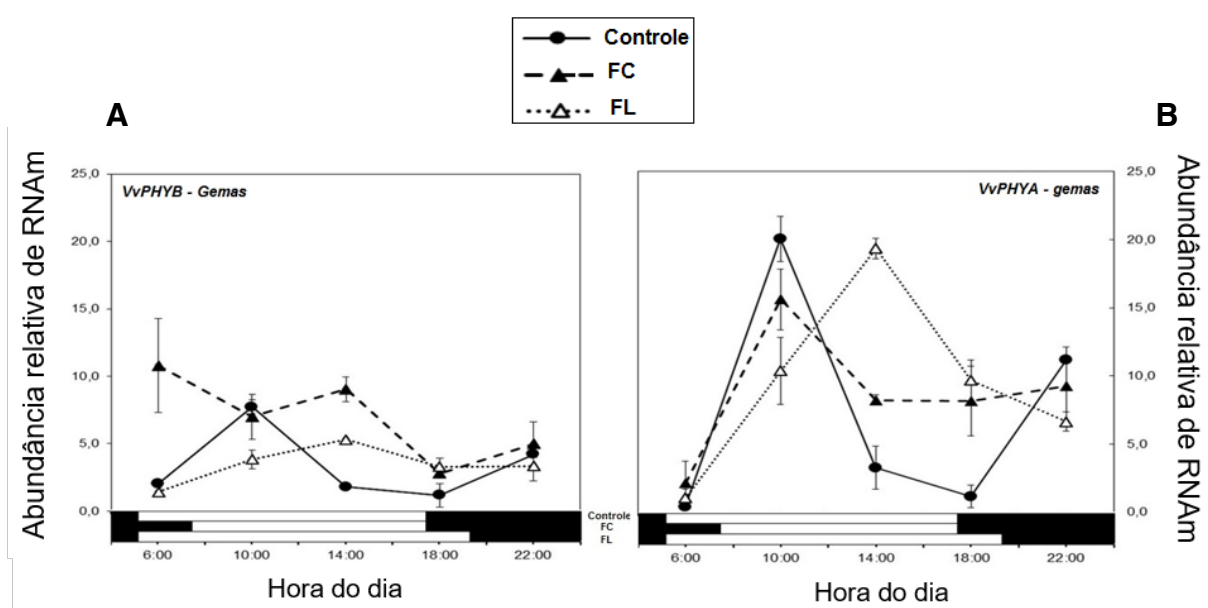


Figura 13. Padrão de expressão diária de transcritos após 8 semanas de tratamento fotoperiódico: Abundância relativa de RNAm de (A) VvPHYB e (B) VvPHYA em gemas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada', crescidas em casa de vegetação em Mossoró, RN (5°12'16"S de latitude).

O padrão de expressão diário dos transcritos de VvFT nas gemas e em folhas ocorreu de forma distinta. Em folhas, o Controle apresentou maior nível de expressão comparado ao FC na parte da manhã, atingindo um pico máximo às 10:00 h, enquanto o FC apresentava pico mínimo de transcrição neste horário e máximo às 18:00 h (Figura 13A).

Em condições de FL foi observado às 6:00 h níveis maiores que no Controle e em FC, respectivamente e uma queda a partir desse horário até às 14:00 h, ponto a partir do qual os níveis de transcritos começam a aumentar até às 22:00 h, pico máximo de expressão (Figura 14A).

No geral observou-se uma maior expressão de transcritos de VvFT em folhas e em gemas, no tratamento FL em relação aos tratamentos FC e Controle, respectivamente (Figura 14A).

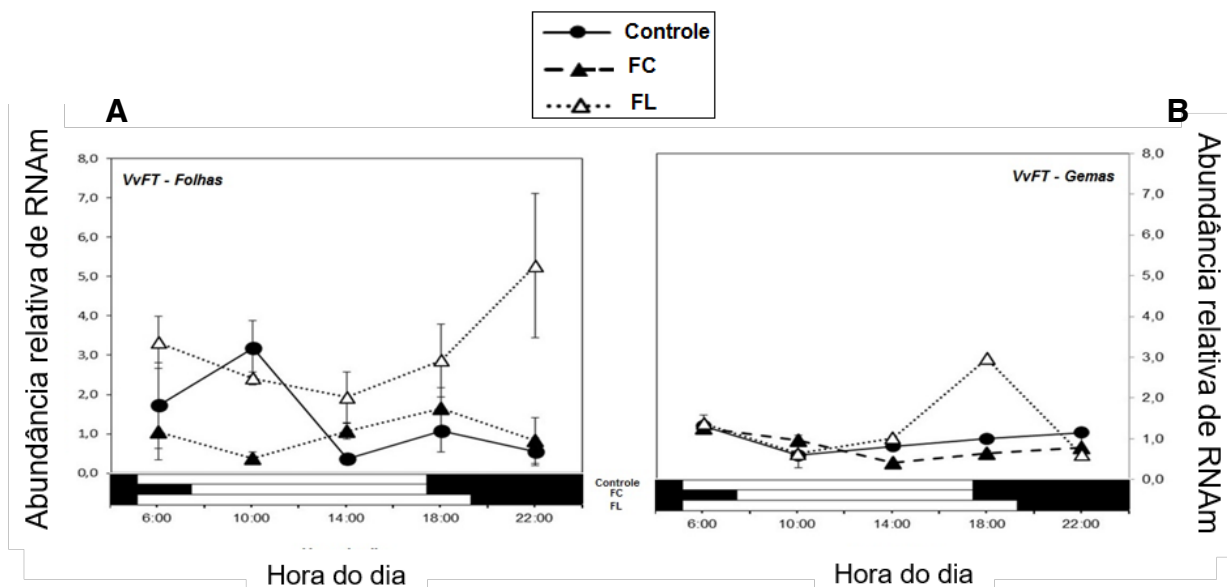


Figura 14. Padrão de expressão diária de transcritos após 8 semanas de tratamento fotoperiódico: Abundância relativa de RNAm de (A) VvFT em folhas, (B) VvFT em gemas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada', crescidas em casa de vegetação em Mossoró, RN (5°12'16"S de latitude).

Nas gemas, ao contrário do que ocorreu nas folhas, às 6:00 h os níveis de transcritos de VvFT dos tratamentos Controle, FC e FL, coincidem. A partir das 10:00 h FC cai ao seu pico mínimo às 14:00 h e os tratamentos Controle e FL aumentam seus níveis de transcrição. O tratamento FL atinge seu pico máximo às 18:00 h e depois decresce atingindo a menor expressão às 22:00 h, enquanto o Controle tem um aumento linear até às 06:00 horas, porém com menor abundância quando comparado ao FL. Aqui também foi observado, assim como ocorreu nas folhas, que o tratamento FL apresentou maior abundância de transcritos de VvFT (Figura 14B).

6.2. Experimento 2 - Fenologia e produção de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' cultivada em região tropical de baixa latitude

A duração das fases dos dois ciclos de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' está exposta na Tabela 12. Como não houve diferenças entre os porta-enxertos quanto ao dia do início para completar cada estágio de desenvolvimento, os dados expostos são relacionados aos três porta-enxertos (IAC 313, IAC 572 e IAC 766) em conjunto. O primeiro ciclo teve duração de quatro dias a mais em relação ao segundo, 115 e 111 dias, respectivamente. Essa diferença deu-se devido à maior duração nas E5 (maturação à colheita).

O subperíodo entre a floração e frutificação, foi igual nos dois ciclos, com quatro dias de duração. No subperíodo E4 (frutificação e maturação) houve uma extensão de cinco dias no segundo ciclo em relação ao primeiro (Tabela 12).

Considerando o ciclo a partir da brotação (DAP), ocorreu uma diferença de apenas dois dias na duração do ciclo, 106 para o primeiro ciclo e 104 para o segundo.

Tabela 12. Duração em dias entre as diferentes fases fenológicas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' em dois ciclos de produção. Mossoró, RN, 2013.

Ciclo	Data de poda	Fases fenológicas*					Total
		E1	E2	E3	E4	E5	
1°	19/04/2013	9	23	4	51	28	115
2°	25/09/2013	7	20	4	56	24	111
	Média	8	21,5	4	53,5	26	113

E1(Poda a brotação); E2 (Brotação à floração); E3 (Floração à frutificação); E4 (Frutificação à maturação); E5 (EL38: Maturação à colheita).

O resumo da análise de variância para o peso, comprimento, diâmetro do cacho, número, peso, comprimento e diâmetro da baga, está exposto na tabela 13 e demonstra não haver significância para interação (Ciclo x Porta-enxerto) para todas as características avaliadas, apresentando significância a 1% de probabilidade pelo teste F entre os ciclos.

Tabela 13. Resumo da análise de variância de sete características relacionadas à produção em dois ciclos de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada sobre três porta-enxertos nas condições de semiárido. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

FV	GL	F (características de produção)						
		PC	CC	DC	NB	PB	CB	DB
Bloco	5	0,89 ^{ns}	0,99 ^{ns}	1,56 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,71 ^{ns}	5,02*	4,79*
Porta-enxerto (P)	2	1,82 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,22 ^{ns}	4,93*	7,70**
Ciclo (C)	1	45,38**	64,97**	425,83**	35,50**	62,18**	49,84**	47,38**
P x C	2	1,13 ^{ns}	0,370 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,23 ^{ns}	1,59 ^{ns}
Q _{MERRO} a	10	28306,05	399,58	73,80	0,86	1,109	0,826	2,669
Q _{MERRO} b	15	21876,79	529,13	57,68	1,160	1,017	0,846	2,860
CV _a (%)		38,37	23,14	9,62	4,48	20,61	8,84	9,37
CV _b (%)		33,73	26,62	8,51	5,20	1,11	8,95	9,69

PC: peso do cacho (g); CC: comprimento do cacho (mm); DC: diâmetro do cacho (mm); NB: número de bagas (unid.); PB: peso de bagas (g); CB: comprimento da baga (mm); DB: diâmetro da baga (mm). *: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F de Snedecor. ^{ns}: não significativo.

Quando comparou a utilização de cada porta-enxerto dentro do ciclo, verificou que não houve diferenças significativas para o peso, comprimento e diâmetro do cacho nos dois ciclos de produção de 'Itália Melhorada'. Assim como também não houve influência dos porta-enxertos sobre o número, peso, comprimento e diâmetro de bagas nos dois ciclos (Tabela 14).

Tabela 14. Médias de sete características relacionadas à produção em dois ciclos de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada sobre três porta-enxertos nas condições de semiárido. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

Ciclo	Porta-enxerto	Médias (características de produção)						
		PC	CC	DC	NB	PB	CB	D4
1	313	482,65a	106,50a	59,55a	21,56a	18,91a	10,48a	16,91a
	572	703,95a	125,17a	65,92a	22,05a	19,32a	11,74a	20,74a
	766	619,78a	118,80a	61,24a	21,71a	19,14a	11,82a	20,30a
2	313	254,12a	50,56a	121,40a	19,53a	22,24a	8,64a	14,45a
	572	248,07a	51,08a	118,80a	19,40a	22,05a	9,07a	15,51a
	766	260,50a	54,45a	119,44a	19,52a	22,42a	9,57a	16,22a

PC: peso do cacho (g); CC: comprimento do cacho (mm); DC: diâmetro do cacho (mm); NB: número de bagas (unid.); PB: peso de baga (g); CB: comprimento da baga (mm); DB: diâmetro da baga (mm). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

A Tabela 15 mostra as médias encontradas para as características de produção de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada'. Os cachos foram significativamente mais pesados no ciclo 1 (601,09 g) do que no ciclo 2 (254,23 g), no conjunto dos três porta-enxertos usados. O mesmo observou-se para comprimento dos cachos, comprimento, diâmetro e número de bagas. O diâmetro dos cachos foi maior no ciclo 2 (119,88 mm) que no ciclo 1 (62,29 mm), o que se refletiu também no peso das bagas (Tabela 15).

Tabela 15. Médias de sete características relacionadas à produção de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada em dois ciclos nas condições de semiárido. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

		Médias (características de produção)						
		PC	CC	DC	NB	PB	CB	DB
Ciclos	1	601,09a	116,71a	62,29b	21,77a	19,12b	11,32a	19,25a
	2	254,23b	52,03b	119,88a	19,48b	22,24a	9,09b	15,39b

PC: peso do cacho; CC: comprimento do cacho; DC: diâmetro do cacho; NB: número de bagas; PB: peso de bagas; CB: comprimento da baga; DB: diâmetro da baga. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Na Tabela 16 está exibido o quadro de análise de variância para os sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT) e relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável (SST/ATT). Os SST não apresentaram diferenças significativas entre os blocos, porta-enxertos e interação (porta-enxerto x Ciclo), porém foi significativo a 1% de probabilidade pelo teste F entre os ciclos. A ATT não apresentou significância em nenhum dos fatores de variação e a relação SST/ATT apresentou significância a 5% de probabilidade pelo teste F entre os ciclos (Tabela 16).

Tabela 16. Resumo da análise de variância de três características relacionadas à qualidade de bagas em dois ciclos de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada sobre três porta-enxertos nas condições de semiárido. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

FV	GL	F (características de qualidade)		
		SST	ATT	SST /ATT
Bloco	5	1,20 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,18 ^{ns}
Porta-enxerto (P)	2	0,63 ^{ns}	1,43 ^{ns}	1,95 ^{ns}
Ciclo (C)	1	10,63 ^{**}	0,99 ^{ns}	4,80 [*]
P x C	2	1,02 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,53 ^{ns}
QMERRO a	10	3,78	0,032	57,61
QMERRO b	15	1,50	0,042	91,91
CV _a (%)		30,30	10,90	23,23
CV _b (%)		10,90	35,05	29,35

SSt: sólidos solúveis totais; ATT: acidez total titulável; SST/ATT: relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável. **: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F de Snedecor. ^{ns}: não significativo.

Para as três características avaliadas (SST, ATT e SST/ATT) não foram observadas diferenças significativas com o uso dos diferentes porta-enxertos nos dois ciclos de produção de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' (Tabela 17).

Tabela 17. Médias de três características relacionadas à qualidade de bagas em dois ciclos de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' avaliada sobre três porta-enxertos nas condições de semiárido. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

Ciclo	Porta enxerto	Médias (características de qualidade)		
		SST	ATT	SST /ATT
1	313	19,55a	0,604a	33,77a
	572	19,30a	0,508a	38,35a
	766	18,65a	0,457a	41,23a
2	313	16,18a	0,693a	27,35a
	572	16,43a	0,665a	25,89a
	766	18,19a	0,490a	37,34a

SST: sólidos solúveis totais; ATT: acidez total titulável; SST/ATT: relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

A análise dos dois ciclos revelou diferenças entre ciclos para SST das bagas. Percebe-se que no primeiro ciclo os valores, expressos em °Brix, foram maiores (19,24), independentemente do porta-enxerto, isso se refletiu na maior relação SST/ATT também no primeiro ciclo (Tabela 18).

Tabela 18. Médias de três características relacionadas à qualidade das bagas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' em diferentes ciclos nas condições de semiárido. Mossoró-RN, UFERSA, 2014.

Ciclo	Média (características de qualidade)		
	SS	ATT	SS /ATT
1	19,24a	0,535a	37,16a
2	16,78b	0,632a	29,30b

SST: sólidos solúveis; ATT: acidez total titulável; SS/ATT: relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

7. DISCUSSÃO

A videira é uma frutífera de clima temperado que possui grande importância econômica mundialmente, sendo sua produtividade intimamente relacionada a uma eficiente saída da dormência. Este processo pode ser definido como a capacidade da planta iniciar o crescimento meristemático em gemas em condições climáticas favoráveis. Como os mecanismos de controle fisiológico e molecular da dormência em videira ainda são pouco compreendidos, procurar-se-á esclarecer, a seguir, alguns pontos considerados úteis para um melhor entendimento deste fenômeno fisiológico.

A proposta deste trabalho foi analisar o comportamento adaptativo da videira em condições controladas de fotoperíodo e o seu desempenho produtivo no campo em condições de baixa latitude ($5^{\circ}12'16''\text{S}$), ou seja, com variações mínimas de fotoperíodo e sob condições de alta temperatura durante todo ano, com média máxima $33,6^{\circ}\text{C}$ e média mínima $22,5^{\circ}\text{C}$ (Oliveira, 2014).

O desenvolvimento de ED é parte do processo evolutivo, pelo qual as gemas se adaptaram para suportar as condições desfavoráveis de inverno, em que a gema permanece incapaz de brotar. Outro papel da ED é evitar o surgimento de brotação em resposta às temperaturas quentes transitórias durante o inverno, evitando assim danos por geada posterior. Além de ED, a tolerância ou resistência ao congelamento também se desenvolve em gemas de videira em resposta a baixas temperaturas não congelantes, um fenômeno conhecido como aclimação ao frio. Essa condição ocorre em climas temperados, que possuem variações sazonais

bem definidas, com invernos rigorosos. Quando se discute sobre o comportamento adaptativo da videira em regiões de cultivos tropicais, a fisiologia do desenvolvimento da videira toma outro rumo, pois, na maioria das vezes, se observa déficits de frio.

Parte do nosso trabalho teve como base esta fundamentação, do papel crucial da temperatura para a fisiologia das gemas, mas também pensamos em outro aspecto climático que tem se mostrado influente para o processo de entrada da ED, o fotoperíodo. Dentre os vários métodos de avaliação utilizados para determinar a aclimação ao fotoperíodo seguido da aclimação ao frio em tecidos de *Vitis*, estão o desenvolvimento da periderme, teor de água nos tecidos e mudanças no comprimento do ramo e número de nós.

Nas condições experimentais em casa de vegetação, onde simulamos as condições de fotoperíodos curto e longo, observamos que a presença de periderme, menor emissão de nós e o menor teor relativo de água e espessamento de parede celular em FC parecem indicar que os tecidos iniciaram o processo de aclimação, tal qual como ocorre nas regiões temperadas.

A interrupção do crescimento é considerada um passo inicial no processo de desenvolvimento de dormência e tem sido amplamente documentada como uma resposta rápida para o desenvolvimento de tolerância ao congelamento. Ela envolve a cessação da divisão celular em tecidos meristemáticos apicais e axilares.

As reduções sazonais na duração do dia e da temperatura que precedem o inverno podem sinalizar a cessação de crescimento em árvores, quer isoladamente ou em combinação, dependendo das espécies (Heide, 2005; Junttila, 1980) e a redução de comprimento do dia, ao contrário de temperatura, mantém-se constante a uma localização geográfica em particular e a uma data específica. Portanto, é uma sugestão ambiental consistente para respostas de antecipação das árvores para a aproximação do inverno, particularmente nas regiões temperadas. A cessação do crescimento é induzida quando o sinal de redução de fotoperíodo (dias curtos) é percebido. Isso ocorre quando fotoperíodo cai abaixo do fotoperíodo crítico para o seu genótipo (Howe, 1995). Um dado interessante apresentado no trabalho é que mesmo não havendo diferenças significativas entre os tratamentos Controle, FC e FL para o comprimento dos ramos, os resultados demonstraram que ocorreram diferenças significativas para emissão de nós. Os tratamentos FC e Controle apresentaram desenvolvimento similar, enquanto que em FL o número de

nós foi superior, indicando que o processo de emissão de novos nós em FL foi mais acelerado, sugerindo então que a exposição aos fotoperíodos menores que 13 horas, que é o crítico para a transição dormência em *Vitis vinifera* (Kuhn et al., 2009), pode ter dado início ao processo de interrupção do crescimento.

Apesar de ter sido relatado que o fotoperíodo por si só já induz à parada de crescimento e à indução da endodormência em certos genótipos de *Vitis*, (Fennell e Hoover, 1991; Wake e Fennell, 2000), também foi relatado que em *Vitis*, a entrada de gemas em ED não está associada à parada do crescimento vegetativo e formação de gema definida (“*bud set*”), como no modelo da planta perene lenhosa álamo (Jansson e Douglas, 2007). As gemas laterais da videira, chamadas de gemas latentes compostas, crescem na axila foliar e entram em ED depois de perceberem o sinal de FC, enquanto o meristema apical continua crescendo até a chegada de temperaturas baixas (Morrison, 1991), portanto as altas temperaturas da casa de vegetação (29/31°C), coletadas nas condições experimentais descritas, também podem ter influenciado o crescimento contínuo dos ramos, pois nas nossas condições experimentais não houve ocorrência de temperaturas baixas para provocar a interrupção do crescimento do meristema apical.

Alguns trabalhos com outras espécies vegetais demonstraram que alta temperatura pode alterar as respostas ao fotoperíodo. Em morango, um aumento de temperatura em 3°C diminuiu o fotoperíodo crítico para a floração em 2 horas (Heide e Sonstebj, 2007), em salgueiro (*Salix pentandra*), temperaturas de 21°C foram suficientes para retardar o aparecimento de dormência (Junttila, 1980) e em espécies do gênero *Prunus*, a cessação do crescimento foi suprimida sob FT induzido a 21°C (Heide, 2008). Em videira ‘White Reisling’, SD também não teve aclimação esperada quando fornecida isoladamente, mas em conjunto com baixas temperaturas, a planta foi aclimatada e aumentou sua tolerância ao frio. (Schnabel e Wample, 1987).

Outra evidência de que as plantas expostas ao FC e Controle deram início ao processo de aclimação ao frio é o desenvolvimento da periderme observado durante o período experimental nestes dois tratamentos, o que não foi observado em FL. A periderme desenvolve-se na planta como tecido de proteção e tecido de cicatrização. O tecido de revestimento externo protege a planta contra temperaturas extremas, provocadas, por exemplo, por fogo, geada e radiação solar. Evita superaquecimento das estruturas internas, constituindo-se em um isolante térmico

(Appezzato da Gloria e Guerreiro, 2012). No final do verão e no outono o exterior dos entrenós basais torna-se marrom. Este escurecimento é referido como "maturação da madeira" ou "formação periderme" e sua formação precoce e intensa em ramos é associada ao desenvolvimento de aclimação ao frio (Goffinet, 2004).

Foram também observadas modificações na espessura da parede celular das células do meristema, sendo que sob FC as células apresentaram, ao final de oito semanas, uma espessura média de 2,5 vezes maior que o Controle e FL (Figuras 9 e 11). Essa modificação anatômica, está relacionada à ocorrência de endodormência, assim como a diminuição de conteúdo de água nos tecidos e desenvolvimento de periderme em resposta ao FC, que também foram observados no experimento.

Foi visualizado também o que parece ser a obstrução de plasmodesmas das células do meristema por calose em FC (Figura 9C), porém esses dados não são conclusivos, já que tem apenas uma imagem ilustrando o caso. O estado de dormência, neste contexto, pode ser investigado a partir da perspectiva de comunicação célula-célula, sendo a endodormência o bloqueio temporário dos plasmodesmas por 1,3- β -D-glucano (calose) que impediria o desenvolvimento de sinalização no meristema e esta interrupção seria desfeita depois do meristema receber um período adequado de refrigeração que favoreceria a ação 1,3- β -D-glucanase e dissolução da calose (Rinne e van der Schoot., 2004). Em videira não há nenhum relato de obstrução de plasmodesma por calose, porém estudos feitos por Vergara et al. (2010) em gemas endodormentes de *Vitis* cv. Thompson Seedless não mostraram alteração nos transcritos da 1,3- β -D-glucanase com tratamentos de baixa temperatura, mas a aplicação de compostos de quebra de dormência (cianamida hidrogenada e azida sódica) induziu a expressão de Vv β GLU22 e Vv β GLU78, dando um indicativo de que esse fenômeno poderia ocorrer nessa espécie.

Isto sugere que uma via termo sensível, pelo menos em videira, pode alterar os padrões de sinalização do fotoperiodismo nas respostas ao ambiente. Em outras palavras, parece que há uma espécie de transição de sinais, em espécies sensíveis, entre a redução do fotoperíodo e a redução da temperatura, considerando que é nessa ordem que estas variações ocorrem em latitudes elevadas, para que ocorra a entrada em endodormência.

A percepção da luz está associada aos fotorreceptores nas plantas. Eles tornam possível regular o desenvolvimento da planta, tirando o máximo de informação do ambiente em que ela se encontra. Diversas famílias de fotorreceptores foram descritas, e duas delas, os fitocromos e os criptocromos, parecem conferir papel especial no fotoperiodismo. Procuramos entender se os sinais relacionados à interrupção do crescimento em *Vitis vinifera* em resposta à redução do fotoperíodo tinham relação com a expressão diferencial dos genes VvPHYA, VvPHYB.

Os níveis de transcritos VvPHYA mais baixos observados em gemas e folhas de plantas sob FC (Figura 12B e 13B) podem dar um indicativo de que os tecidos responderam positivamente à redução do fotoperíodo, diminuindo a emissão de novos nós. Esta afirmativa tem como base que a redução dos níveis de VvPHYA em *Populus* promove mudanças nos ritmos diários controlados pelo relógio biológico, resultando em desaceleração do crescimento (Kozarewa et al., 2010). De acordo com o modelo hipotético de Kozarewa et al. (2010), menores níveis de expressão de PHYA não reprimem genes LHY (*Late Elongated Hypocotyl*) e com isso a percepção do SD não é percebida pelo gene de regulação do relógio biológico CO2 (*Circadian Clock Associated 2*). Como resultado, os genes FT são expressos em muito menor nível, o que explicaria a interrupção do crescimento. Um outro modelo proposto por Hovarth (2009) para *Populus*, propõe que a sinalização por FC seja regulada via relógio circadiano ou talvez diretamente por meio da ação do PHYA, mediando uma sinalização em cascata, que reprime expressão a *CONSTANS* (CO) e pode induzir a expressão do gene *Dormancy Associated Mads Box* (DAM). Com a acumulação de proteínas DAM é provável que estas se liguem aos sítios de regulação de FT e/ou ao *CENTRORADIALIS-Like* (CENL), reprimindo-os. A expressão reduzida FT seria necessária para a parada do crescimento e baixa expressão de CENL tem sido associada com a indução de dormência (Ruonala et al, 2008). Assim, repressão destes genes provavelmente induziria à dormência em gemas de plantas perenes. O CENL1, um ortólogo em *Populus* de *Terminal Flower1* (TFL1) de *Arabidopsis thaliana* foi regulado negativamente no meristema apical do WT híbrido (*Populus tremula* x *P. tremuloides*) coincidindo com a interrupção do crescimento induzido pelo FC (Ruonala et al, 2008). De fato, as figuras 14A e 14B mostram os níveis bastante reduzidos de transcritos VvFT em gemas e em folhas expostas ao FC, mesmo

abaixo dos níveis encontrados nas plantas controle, com fotoperíodo de 12 horas. Em *Populus* transgênico, a expressão constitutiva de *PtFT1*, o ortólogo *Populus* de FT de *Arabidopsis*, a parada do crescimento sazonal e a transição para a dormência não ocorrem, sugerindo que a FT tem um papel-chave na parada do crescimento induzida por FC e desenvolvimento de dormência nessa espécie (Böhlenius et al., 2006).

Em folhas, os níveis detectados de transcritos do VvPHYA sob FC foram menores que em FL (Figura 12B), isso pode demonstrar que estes órgãos podem se comportar como órgãos autônomos ou semiautônomos (Pérez et al., 2011), considerando que, sob influência da alta temperatura mesmo sob FC, as folhas mantiveram seu crescimento. Embora não tenhamos medido taxas metabólicas nos tecidos foliares, parece haver uma relação direta entre níveis de PhyA e metabólitos chave ligados à respiração (oxoglutarato), e na biossíntese de auxinas (triptofano) (Kusano et al., 2011). Isso explicaria que as folhas teriam elementos básicos para a manutenção do seu crescimento.

Em nossas condições experimentais foram observadas oscilações circadianas nos níveis dos transcritos de VvPHYA e VvPHYB em folhas, tanto em FC quanto em FL, ao contrário do que foi observado em Santiago, Chile (33°34'S) em folhas da videira 'Thompson Seedless' *Vitis vinifera* L, que sob FL a abundância do transcrito oscilou com ritmos diários e sob FC a expressão rítmica desapareceu e ambas as transcrições foram expressas uniformemente (Kühn et al, 2009).

Como foi exposto nos resultados de campo, as condições ambientais de Mossoró possibilitaram o cultivo da videira *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada'. A variedade apresentou comportamento fenológico similar nos dois ciclos, com o comprimento do ciclo de produção variando entre 113 a 115 dias de acordo com a época de poda, resultados semelhantes aos encontrados na região do Submédio do Vale do São Francisco, em que a duração do ciclo fenológico, desde a poda até a colheita, variou de 115 a 112 dias (Leão et al, 2011).

A característica de tamanho de bagas de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' para região de Mossoró, com aproximadamente 10,2 mm de comprimento e 17,32 mm de diâmetro, foi inferior ao tamanho de bagas na região do Submédio do Vale do São Francisco, que apresentaram 31 mm de comprimento e 26 mm de diâmetro (Leão et al., 2011).

Como as condições climáticas nos períodos avaliados não sofreram variações bruscas de isolamento e temperatura, o valor médio de SST superior no primeiro ciclo em relação ao segundo, pode ter ocorrido como consequência da antecipação da colheita no segundo ciclo, devido ao ataque de abelhas que ocorreu nesse período, impedindo assim, o aumento da concentração de açúcares nos frutos na fase final de maturação. Nos dois ciclos, os teores de SST foram superiores ao limite mínimo de 15°Brix exigido para comercialização de uvas de mesa (CODEVASF, 1994).

Os teores de ATT obtidos nos dois ciclos de produção, 0,53% e 0,63%, foram inferiores ao limite recomendado de 0,75% (CODEVASF, 1994; Gorgatti et al., 1993). Valores mais elevados foram encontrados na região do Submédio do Vale do São Francisco, cuja média foi de 0,68% (Leão et al., 2011). O teor de SST discretamente superior e a menor ATT obtida em *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' no primeiro ciclo, resultaram na melhor relação SST/ATT neste ciclo, esta característica, aliada ao fato de apresentar um sabor moscatel acentuado é um aspecto positivo desta variedade, que a torna um grande potencial para cultivo.

Os estudos sobre a fenologia e qualidade dos frutos confirmam o potencial produtivo desta variedade para a região, onde é possível obter duas colheitas anuais. Porém, a produção nessas condições só foi possível com o uso do indutor de brotação Dormex®, já que em climas tropicais, caracterizados pela ausência total de temperaturas adequadas para a quebra de dormência (sempre acima de 20°C) (Faust, 2000) as brotações se mostram irregulares. Essa irregularidade pode estar associada também à aclimação incompleta induzida pelo fotoperíodo natural de 12 horas (abaixo do fotoperíodo crítico para a espécie de 13 horas) nesta latitude, onde pode comprovar, por meio dos resultados apresentados no experimento I, que o Controle não apresentou espessamento de parede celular, que é uma característica anatômica crucial para aclimação ao frio.

Embora este trabalho propicie indicações sobre a duração das diferentes fases fenológicas em *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' na região, deve-se considerar estas informações como preliminares. Outras observações fenológicas devem ser realizadas por vários anos produtivos, para que o seu potencial possa ser devidamente avaliado e caracterizado, assim como, novos trabalhos também devem ser realizados para avaliar e caracterizar a intensidade de dormência nas gemas axilares da videira nessas condições.

8. CONCLUSÕES

Experimento I:

- Houve expressão diferencial de VvPHYA, VvPHYB e VvFT em folhas e em gemas de *Vitis vinifera* cultivadas sob condições distintas de fotoperíodo e temperaturas altas;
- Em condições de FC o nível de expressão de VvPHYA e VvFT foi menor nas gemas e em folhas quando comparado ao FL, onde foram altamente expressos, sendo que nesta condição não foram observadas modificações anatômicas características da aclimação ao frio e endodormência;
- Os tratamentos FC e Controle apresentaram número de nós, comprimento dos ramos e teor de água nos tecidos dos nós inferiores ao FL e desenvolvimento de periderme, que não foi observado em FL. No entanto, espessamento da parede celular das células dos meristemas só foi observado no tratamento FC, indicando que em condições naturais de fotoperíodo (Controle) ocorreu uma aclimação incompleta;
- Todas essas modificações relacionadas à aclimação ao frio e endodormência ocorreram em altas temperaturas, portanto os resultados apresentados sugerem que o FC induz à endodormência e aclimação por meio de uma via diferente à via mediada por baixa temperatura.

Experimento II

- Os resultados demonstraram que os dois ciclos de produção de *Vitis vinifera* L. 'Itália Melhorada' durante o ano são equivalentes quanto à duração das

fazes fenológicas e quanto à qualidade do fruto, devido principalmente às condições constantes de insolação (fotoperíodo) e de temperaturas ao longo do ano;

- Os porta-enxertos IAC 313, IAC 572 e IAC 766 equivaleram-se em todos os aspectos avaliados podendo ser usados indistintamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ: (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11:36–42.
- Alvarenga, A.A., Abrahão, E., Regina, M.A. (1998) Origem e classificação botânica da videira. *Informe Agropecuário*, 19 (194): 5-8.
- Appezzato-da-Glória, B.; Carmello-Guerreiro, S. M. (Org.), (2012). *Anatomia Vegetal*. 3ª. ed. Viçosa:, v. 01. 404p
- Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa, Brunnert AM, Jansson SH, Strauss S, et al. (2006). CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*;312:1040–3.
- Bonhomme, R. (2000): Bases and limits to using “degree-day” units. – *Eur. J. Agron.* (13): 1-10.
- Boone (1996). Photoperiod effects on cold acclimation of grape rootstocks, dissertação de mestrado. Texas.
- Carmo Filho F.; Oliveira O. F. (1995). Mossoró: um município do semi-árido nordestino, caracterização climática e aspecto florístico. Mossoró: ESAM, (Coleção Mossoroense, Série B) 62p.

- Carmo Filho, F.; Oliveira, O.F. (1989) Mossoró, um município semiárido nordestino: Características Climáticas e Aspectos Florísticos. Mossoró: ESAM. (Coleção Mossoroense, B, 672.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J.A., (1993). Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 113–116.
- CODEVASF (1994). Tecnologia de manejo pré e póscolheita de uva de mesa. In: CODEVASF. Recomendações para o manejo de colheita e pós-colheita de banana, manga e uva. Brasília, p.149-189.
- Estigarribia Borges, R.M., Barros DE Almeida, M., Cartaxo, F.R.V. (2008). Divergências Morfológicas e de características qualitativas nas variedades de uva Italia e Italia Melhorada no Submédio São Francisco. III. Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica Fortaleza – CE,
- FAO. FAOSTAT database. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. 2010. Acesso em: 15/05/2012.
- Faust M. (2000). Physiological considerations for growing temperate-zone fruit crops in warm climates. In: Erez A (Ed.) *Temperate fruit crops in warm climates* - Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 137-156.
- Fennell A, Hoover E. (1991). Photoperiod influences growth, bud-dormancy and cold acclimation in *V. labruscana* and *V. riparia*. *J Am Soc Hortic Sci*; 116:270-3. (1991)
- Gerrath, J.M. (1992) Developmental morphology and anatomy of grape flowers. *Horticultural Reviews*, New York, v.13, p.315-337.
- Giovannini, E. (1999) *Produção de uvas para vinho, suco e mesa*. Porto Alegre: Renascença, 364p.
- Goffinet, M C. (2004) *Anatomy of Grapevine Winter Injury and Recovery*. Cornell University Department of Horticultural Sciences NY State Agricultural Experiment Station Geneva, NY 14456. Date: 28 February.
- Gorgatti Netto, A.; Gayet, J. P.; Bleinroth, E. W.; Matallo, M.; Garcia, E.; Garcia, A. E.; Ardito, E. F. G.; Gordim, M. (1993), *Uva para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita*. Brasília:EMBRAPA-SPI/FRUPEX,40p. (Publicações Técnicas, 2).

- Heide OM, Prestrud AK: (2005), Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. *Tree Physiol*, 25:109-114.
- Heide, O. M. e Sønsteby, A. (2007), Interactions of temperature and photoperiod in the control of flowering of latitudinal and altitudinal populations of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Physiologia Plantarum*, 130: 280–289.
- Heide, O.M.(2008). Interaction of photoperiod and temperature in the control of growth and dormancy of *Prunus* species. *Scientia Hort*. 115:309–314.
- Horvath, D. (2009) Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Sci*.177:523-531.
- Howe GT, Hackett WP, Furnier GR, Klevorn RE: (1995) Photoperiodic responses of a northern and southern ecotype of black cottonwood. *Physiol Plant*, 93:695-708.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010) Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: abril de 2012.
- IBRAF. Frutas Frescas: exportações (2011). Disponível em: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp.
- Jansson, S., Douglas, C.J. (2007). *Populus*: a model system for plant biology. *Annual Rev Plant Biol*.;58:435–58.
- Junttila, O. (1980). Flower bud differentiation in *Salix pentandra* as affected by photoperiod, temperature and growth-regulators. *Physiol. Plant*. 49:127–134.
- Kozarewa I., Cristian Ibáñez, Mikael Johansson, Erling Ogren, David Mozley, Eva Nylander, Makiko Chono, Thomas Moritz, Maria E. Eriksson. (2010) Alteration of PHYA expression change circadian rhythms and timing of bud set in *Populus*. *Plant Mol Biol* 73:143–156.
- Kühn N, Ormeño-Nuñez J, Jaque-Zamora G, Pérez FJ.(2009). Photoperiod modifies the diurnal expression profile of VvPHYA and VvPHYB transcripts in field grown grapevine leaves. *J Plant Physiology*

- Kusano, M., Jonsson, P., Fukushima, A., Gullberg, J., Sjöström, M., Trygg, J. e Moritz, T. (2011). Metabolite signature during short-day induced growth cessation in *Populus*. *Frontiers in Plant Science*, 29: 1-11.
- Lang, G. A. (1987) Dormancy a new universal terminology. *Hortic Sci*, 22:817-20
- Leão, P.C. de S.; Brandão, E.O.; Gonçalves, N.P. da S. (2011). Caracterização agronômica e molecular do clone Itália Muscat no submédio do Vale do São Francisco. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v. 33, n. 1.
- Leão, P.C.S. (2004) Embrapa Semi-Árido Sistemas de Produção, 1 ISSN 1807-0027. Versão Eletrônica.
- Leão, P.C.S. (2010) Cultivo da videira- Cultivares. Sistemas de Produção Embrapa, 1 – 2a. edição ISSN 1807-0027 Versão Eletrônica. Agosto.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the DDCT method. *Methods* 25:402–408
- Lorenz, D.H.; Eichhorn, K.W.; Bleiholder, H.; Klose, R.; Meier, U.; Weber E. (1995) Growth stages of the grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v.1, p.100-110.
- Mello, L.M.R. (2011). Vitivinicultura brasileira: Panorama 2010. Comunicado Técnico, 111 <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot111.pdf>.
- Morrison, J.C. Bud development in *Vitis vinifera* L. (1991). *Botanical Gazette*, Chicago, v.153, n.3, p.304-315.
- Mullins, M.G., Bouquet, A., Willians, L.E. (1992) *Biology of horticultural crops: Biology of the grapevine*. Ed. Cambridge University Press, pp. 239.
- Oliveira, F.S. DE (2014). Potencial climático da Viticultura no Oeste Potiguar. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, RN. 88p.
- Pérez FJ, Kühn N, R. Vergara (2011) Expression analysis of phytochromes A, B and floral integrator genes during the entry and exit of grapevine-buds from endodormancy. *Journal of Plant Physiology* 168 1659– 1666.

- Petri, J. L.; Palladini, L. A.; Schuck, E.; Ducroquet, J. P.; Matos, C. S.; Pola, A. C. (1996) Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado. Florianópolis: EPAGRI, 110p. (Boletim Técnico, 75).
- Pommer, C.V. (2003) Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 778 p.
- Rinne, P.L.H e van der Schoot, C. (2004) Cell-Cell Communication as a key factor in dormency cycling. *Journal of Crop Improvement*, 10:1-2, 113-156.
- Rinne, P.L.H. e C. van der Schoot. (1998). Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* 125: 1477-1485.
- Rinne, P.L.H., P.M. Kaikuranta & van der Schoot, C. (2001). The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *The Plant Journal* 26: 249-264.
- Rozen,S. Skaletsky, H. (2000). Primer 3 on the www for general users and for biologist Programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132:365–86.
- Ruonala R, Rinne PLH, Kangasjärvi J, van der Schoot C. (2008). CENL1 Expression in the Rib meristem affects stem elongation and the transition to dormancy in *Populus*. *Plant Cell*; 20:59-74.
- Sáure, M.C. (1985). Dormancy release in deciduous fruit trees. *Hortic. Rev.* 7, 239–299.
- Schnabel, B.J. e R.L. Wample. (1987). Dormancy and cold hardiness of *Vitis vinifera* L. cv. White Riesling as influenced by photoperiod and temperature. *Amer. J. Enol. Vitic.* 38:265-272.
- Sousa, J.S.I. (1996) Uvas para o Brasil. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 791p.
- Srinivasan, C.; Mullins, M.G.(1981). Physiology of flowering in the grapevine - A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v.32, n.1, p.47-63,
- Stewart, W.W. (1981). Lucifer dyes: highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature* 292: 17-21

- Stofel, C.B. (2012) Padrões sazonais de florescimento e desenvolvimento de frutos em videira 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L.). Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 57p.
- Vergara, R., Pérez, F.J. (2010) Similarities between natural and chemically induced bud-endodormancy release in grapevine *Vitis vinifera* L. *Sci. Hortic.*, 125 (2010), pp. 648–653
- Wake, C.M.F. & Fennel (2000). Morphological, physiological and dormancy responses of three *Vitis* genotypes to short photoperiod. *Physiologia Plantarum* 109: 203–210.
- Winkler, A.J., Cook, J.A., Kliwer, W.M., Lider, L.A. (1997) *General Viticulture*. Ed. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, pp. 710.

8. APÊNDICES

TRABALHOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DOS DADOS DA TESE

APÊNDICE A

Relationship between Endodormancy and Cold Hardiness in Grapevine Buds

Relationship Between Endodormancy and Cold Hardiness in Grapevine Buds

Sebastián Rubio¹ · Débora Dantas² · Ricardo Bressan-Smith² · Francisco J. Pérez¹

Received: 14 April 2015 / Accepted: 16 June 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Endodormancy (ED) and cold hardiness (CH) are two strategies utilized by grapevine (*Vitis vinifera* L.) buds to survive unfavorable winter conditions. Each phenomenon is triggered by different environmental cues—ED by short-day (SD) photoperiod and cold hardiness (CH) by low temperatures. In grapevine buds, CH occurs mainly via the supercooling of intracellular water, a phenomenon associated with the low temperature exotherm (LTE). The seasonal dynamics of ED and CH were studied on grapevines buds by determining the BR₅₀ (time required to reach 50 % of bud break under forced conditions) and the LTE, which measure the depth of ED and the level of CH, respectively. Overlapping BR₅₀ and LTE curves revealed that CH began to develop in late April, when buds were fully endodormant and daily mean temperatures had started to drop below 14 °C, suggesting that ED is a prerequisite for the acquisition of full CH. Increase in starch content and thickening of the cell wall (CW) of meristematic cells which occurs in dormant buds could be involved in structural and metabolic changes that favor CH subsequent acquisition. Interestingly, the thickening of the CW and the synthesis of starch which are associated with ED were induced by a SD-photoperiod, while the hydrolysis of

starch, the accumulation of soluble sugars, and the up-regulation of dehydrin genes, which are associated with CH, were induced by low temperatures. Overall, the results indicate that structural, metabolic, and transcriptional changes that occur during ED in grapevine buds are necessary for the further development of CH.

Keywords Cold hardiness · Cell wall · Dormancy · Dehydrins · Exotherms · Grapevine buds · Supercooling

Introduction

Grapevines (*Vitis vinifera* L.) develop axillary buds containing embryonic shoots from which whole branches develop after perceiving specific signals (Rohde and Bhalerao 2007). The decreasing photoperiod during late summer is the environmental signal that triggers the transition of buds into endodormancy (ED) (Fennell and Hoover 1991; Kühn and others 2009; Grant and others 2013). ED is a physiological state characterized by growth inhibition, arrest of cell division, and reduced metabolic and respiratory activity. Operationally ED is characterized by a delay in the bud-break response under forced conditions (Lang 1987; Dennis 2003). The development of ED is part of the process by which buds adapt to unfavorable winter conditions. One of the main functions of ED is to avoid bud break in response to a transient warm spell during winter, which could not only avoid further damage by frost (Jian and others 1997), but also play an important role in preparing plants for freezing temperatures (Sakai and Larcher 1987). In tree species with photoperiodically-induced dormancy such as birch (*Betula pendula*), the perception of decreasing day-length results in growth cessation, development of a terminal bud, and progression

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00344-015-9531-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Francisco J. Pérez
frperez@uchile.cl

¹ Laboratorio de Bioquímica Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

² Centro de Ciencias e Tecnologias Agropecuarias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av Alberto Lamego 2000, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

to a dormant and more freezing-tolerant state (Rinne and others 2001). In contrast, species of *Vitis* do not set a terminal bud in response to SD-photoperiod and the shoot apical area does not enter into ED nor cold acclimates; however, upon reaching a critical day-length (CDL), other hallmark phenotypes such as periderm development, growth cessation, and latent bud dormancy are induced (Fennell and Hoover 1991; Wake and Fennell 2000; Sreekantan and others 2010; Grant and others 2013). Freezing tolerance or cold hardiness (CH) also develops in grapevine buds in response to low non-freezing temperatures, a phenomenon known as cold acclimation (Thomashow 1999; Mills and others 2006; Ferguson and others 2011, 2014). It has been reported that the dormant buds of *Vitis riparia* (Pierquet and others 1977) exhibit deep supercooling of intracellular water, suggesting that the depression of the freezing point is the mechanism through which grapevine buds adapt to subfreezing temperatures. Differential thermal analysis (DTA) has been widely used to measure the exotherms of deep supercooled buds, two exotherms are generally observed in cold-acclimated buds, a high-temperature exotherm (HTE) and a low-temperature exotherm (LTE), which correspond to the heat released during the freezing of extracellular and intracellular water, respectively (Burke and others 1976). Lethal tissue damage takes place in buds at temperatures below LTE, indicating that LTE can serve as a measure of CH (Pierquet and Stushnoff 1980; Mills and others 2006; Ferguson and others 2011). Several factors can influence the decrease in the supercooling of water; however, the properties of a cell, tissue, or organ that allow it to undergo deep supercooling remain enigmatic, despite the prevalence of this ability in many plant species (Gusta and Wisniewski 2013). The role of sugars in the development of CH has been well documented in grapevines; total soluble sugars increase during the initial stage of CH, and it is speculated that raffinose plays an important role in cold acclimation in grapevine buds (Grant and others 2013; Hamman and others 1996). Dehydrins, a class of hydrophilic, thermostable stress proteins that belong to the late embryogenesis abundant (LEA) family, are expressed in response to drought, salinity, cold, and osmotic stress (Nylander and others 2001). In buds of *Vitis labruscana* L. cv. Concord, a heat stable 27 KD protein that accumulates in response to cold, was identified as immunologically related to dehydrins by a strong reaction with the antidehydrin antibody (Salzman and others 1996). Recently, four dehydrin genes were identified in *V. vinifera* and *V. yeshanensis*, and their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stresses was studied (Yang and others 2012). This study examined the relationship between ED and CH in grapevine buds, and characterized partially the structural, metabolic, and transcriptional changes that occur during

ED which are necessary for the further acquisition of CH at low temperatures.

Materials and Methods

Seasonal Variations on the Depth of Dormancy in Buds of *V. vinifera* cv. Thompson Seedless

The bud-break response of single-bud cuttings under forced conditions is a common indicator used to describe the depth of dormancy in grapevines (Koussa and others 1994; Dennis 2003). This system makes it possible to work with a large number of buds, providing a proper representation of the dormancy status of a given bud population at a specific point in time during the dormancy cycle. Canes were collected every 2–3 weeks, between 11 December and mid-August 2012, from 8-year-old *V. vinifera* L. cv. Thompson seedless growing at the experimental station of the Chilean National Institute of Agriculture Research (INIA), located in Santiago (33°34'S latitude). Detached canes each carrying ten buds in positions 5–14 were transferred to the laboratory, and cut into single-bud cuttings. Forty of these cuttings (10–12 cm length) were mounted on a polypropylene sheet and floated in tap water in a plastic container on each collection date. The cuttings were then transferred to a growth chamber set at 23 ± 2 °C with a 16 h photoperiod (forcing conditions). Every 5 days, water was replaced in the container and bud break was assayed for a period of 30 days. The appearance of visible green tissue at the tip of the bud was indicative of bud break. The depth of bud dormancy was determined using BR₅₀, a parameter which is an estimate of the mean time required to reach 50 % bud break under forced conditions (Pérez and others 2007). The depth of dormancy has been previously determined in buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless in the same place and with the same methodology, obtaining similar results (Pérez and others 2007; Vergara and Pérez 2010).

Temperature Measurements

Temperature data were collected every hour from the weather station of the National Institute of Agricultural Research (INIA, La Platina) located at 33°34'S latitude 70°40'W longitude, 100 m from the vineyard.

Seasonal Variations on LTE in Buds of *V. vinifera* cv. Thompson Seedless

Canes collected weekly from field-grown *V. vinifera* cv. Thompson seedless between 22 April and 27 August 2012

were cut into single buds. Exotherms were determined in single buds by differential thermal analysis (DTA). Kryoscan, a freezing and data acquisition device that uses Peltier elements (PE) for the cooling and detection modules (Badulescu and Ernst 2006) was employed for DTA. The temperature of the cooling block was pre-chilled at 10 °C using a water bath and further chilled by a pyramidal configuration of PE connected to a temperature controller (PXR-4, Fuji electronic system, Japan). The temperature controller regulates the passing voltage through the PE according to a temperature sensor connected to the cooling block, and by the programmed temperature ramp. Miniature PE (Peltier modules series Opto Tec, Laird Technologies-Engineered Thermal Solutions, USA) instead of thermocouples were used to record exotherms, because they yield a relatively high voltage difference which is less susceptible to electrical noise, and no external zero references are needed (Badulescu and Ernst 2006). These sensitive PE detect temperature gradients generated by the exotherms and convert the thermal signal to voltage outputs. The data acquisition system (Measurement Computing USB 120BLS, USA) and DasyLab software were used to measure and collect the output voltage and the temperature. Signals were recorded every 2 s, and a decrease in temperature of 4 °C per h starting at 10 °C and ending at −30 °C was programmed (Mills and others 2006). Generally, two peaks were observed, one corresponded to HTE that was assigned to the freezing point of extracellular (apoplast) water, which is non-lethal (Burke and others 1976) and the other corresponded to LTE that was assigned to the freezing point of intracellular water, which is lethal (Burke and others 1976). Because lethal tissue damage in grapevine buds occurs at temperatures below the LTE, this value can serve as a measure of CH (Pierquet and Stushnoff 1980; Wolf and Cook 1994; Mills and others 2006). Values for each date correspond to the average of 12 biological replicates of single buds (Fig. 1). LTE measurements were repeated in the same location and with the same variety during 2013.

Effect of Temperature on LTE of Dormant and Non-dormant Buds of *V. vinifera* cv. Thompson Seedless

To analyze the effects of temperature on exotherms of dormant and non-dormant buds, single-bud cuttings of *V. vinifera* cv. Thompson seedless collected on 27 December (non-dormant) and 10 June 2012 (dormant) were exposed to low (5 °C, cooled) and room (14 °C, non-cooled) temperatures, and exotherms were measured in single buds over time (12 buds at each collection time). Dormant buds prior to harvesting were exposed in the field to approximately

200 chilling hours, and therefore, were partially cold acclimated (LTE = −15 °C) before the experiments.

Effect of Dormancy and Low Temperatures on the Starch and Soluble Sugar Content of Buds of *V. vinifera* cv. Thompson Seedless

To study the effect of dormancy on the levels of starch in grapevine buds, starch levels were determined in buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless collected on 27 December (non-dormant) and 10 June 2012 (dormant). To study the effect of low temperature on the starch and soluble sugar content in grapevine buds, buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless collected on 10 June 2012 (dormant) were used. The buds (0.2 g approx.) were ground with a mortar and pestle in liquid nitrogen and extracted 3× with 3 ml of cold acetone and 1× with a mixture of chloroform and isoamyl alcohol (24:1). The suspension was centrifuged at 13,000 rpm for 3 min, and the pellet was dried and extracted with 2 ml 80 % (v/v) ethanol for 30 min in a water bath heated to 60 °C. This extraction was repeated 3 times, and the supernatants were collected, pooled, and dried. The starch content of the pellet was determined after ethanol extraction of the soluble sugars by acid extraction using the anthrone reagent (Hansen and Moller 1975). The dried supernatant obtained from ethanol extraction was dissolved in 100 µl of pyridine and an aliquot of 15 µl was derivatized by adding 5 µl BSTFA (Sigma-Aldrich, USA); the mixture was then heated at 90 °C for 30 min. The chromatographic analyses of the derivatized samples were performed using a Shimadzu GC 2014 gas chromatograph (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a CBP1 capillary column and an FID detector. The operating conditions were as follows: injector and detector temperatures were 180 and 300 °C, respectively; carrier gas flow (helium) at 1.0 ml/min; injection volume of 1 µl with a flow splitter at a ratio of 50:5. The oven was programmed to temperatures of 60–200 °C at a rate of 30 °C min^{−1} and from 200 to 280 °C at a rate of 5 °C min^{−1}. Standard curves were constructed for the determination of the sucrose, glucose, fructose, and starch concentrations.

Influence of Dormancy and SD-Photoperiod on CW Thickness in Meristematic Cells

The thickness of the cell wall (CW) of meristematic cells of non-dormant buds (collected 27 December 20012) and dormant buds (collected 10 June 2012) of *V. vinifera* cv. Thompson seedless grown in Santiago, Chile (33°34'S 70°40'W) was examined by transmission electron microscopy (TEM). The thickness of the CW of meristematic cells of buds of *V. vinifera* cv. Italia melhorada grown in Messoró, Brazil (5°12'S) and exposed to different

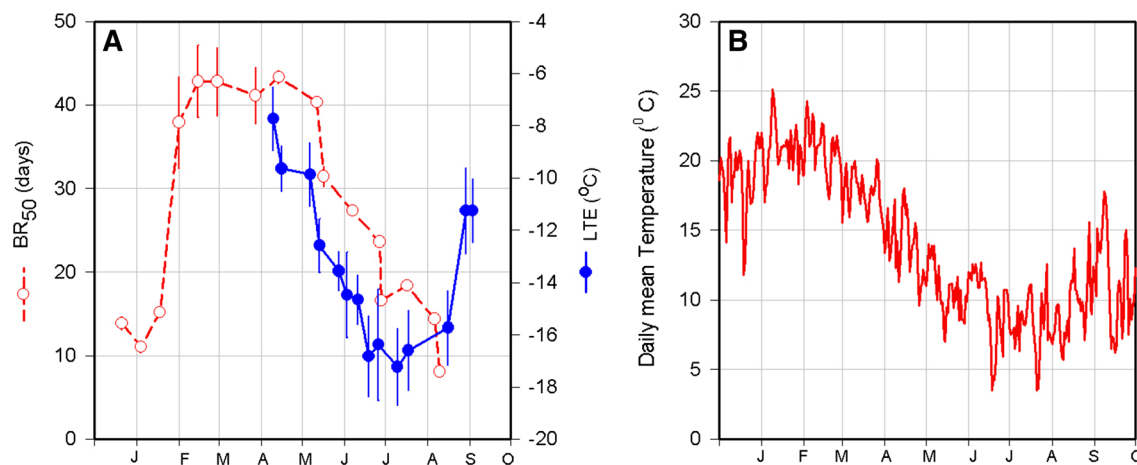


Fig. 1 Comparison of daily mean temperature, endodormancy (ED), and cold hardiness (CH) in grapevine buds. **a** Endodormancy (ED) and cold hardiness (CH) development in *V. vinifera* cv. Thompson seedless. **b** Daily mean temperatures in Santiago, Chile (33°34'S) during the year 2012. The depth of ED was determined by BR₅₀ (time required to reach 50 % bud break under forced conditions). Values of

BR₅₀ for each collection date were determined by Probit Analysis (Minitab statistical software) and bars represent s.d. ($n = 40$). CH was determined by measuring the LTE by differential thermal analysis (DTA) using Peltier modules (TEM). Bars represent s.d. ($n = 16$)

photoperiods was also analyzed by TEM. Sections were taken from the middle of the buds and were fixed in 2 % formaldehyde, post-fixed for 2 h in $0.1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ osmium tetra-oxide, dehydrated in a graded series of ethanol (25, 50, 70, 90, and $3 \times 100 \%$ for at least 1 h for each), and embedded in Spurr's resin. Thin sections were cut with a diamond knife, stained in uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Jeol 100 SX electron microscope. Three buds per treatment were analyzed to determine the thickness of the CW.

Photoperiod Treatments on *V. vinifera* cv. Italia Melhorada

In a collaborative project with colleagues from Brazil, the effect of different photoperiod regimes on the thickness of the cell wall (CW) and on the expression of cellulose synthase, lacasse, and dehydrin genes was performed. Photoperiod experiments were carried out in Messoró, Brazil due to small variations in photoperiod and temperature in the area, making it easier to conduct this type of experiment. Cuttings of *V. vinifera* cv. Italia melhorada on rootstock IAC 572 grown at the Federal University of Rural Semi-Arid (UFERSA), located in Messoró, Brazil (5°12'16"S), where the natural photoperiod during the whole year is (12/12 h day/night) and temperature fluctuates between 29 and 31 °C, were used as plant material for photoperiod experiments (3 replicates per treatment). Rooted cuttings (15 per treatment) were planted into mix 1:1:1 (v: v: v) soil, sand, and muck in 5 l pots. As growth commenced, one shoot was allowed to develop on each cutting. Cuttings having uniform growth with 12–16 leaves

were selected and randomly assigned to each photoperiod treatment for 8 weeks. Photoperiod experiments were conducted in a greenhouse under LD (14/10 h day/night) and SD-photoperiod (10/14 h day/night), because the critical day-length (CDL) for dormancy transition in *V. vinifera* is about 13 h (Kühn and others 2009). Supplemental light was provided automatically in the afternoon at 17:30 h using a 100 W fluorescent tube; light restriction was imposed with a black plastic sheet in the early morning at 4:30 h. After the treatments, buds were lyophilized for gene expression analysis, and fixed in 2 % formaldehyde for TEM analysis.

Photoperiod and Low-Temperature Effect on the Expression of Dehydrin Genes

For photoperiod experiments, total RNA was isolated from lyophilized buds (0.05–0.1 g) of *V. vinifera* cv. Italia melhorada. For low-temperatures experiments, total RNA was isolated from buds (0.5–0.7 g) of *V. vinifera* cv. Thompson seedless. In both cases, total RNA was extracted and purified using a modification of the method of Chang and others (1993), as described in Noriega and others (2007). DNA was removed by treatment with RNAase-free DNAase (1 U/ μg) (Invitrogen, CA, USA) at 37 °C for 30 min. First-strand cDNA was synthesized from 5 μg of purified RNA with 1 μL oligo(dT)_{12–18} ($0.5 \mu\text{g} \times \mu\text{L}^{-1}$) as primer, 1 μL dNTP mix (10 mM), and Superscript® II RT (Invitrogen, USA). Gene expression analysis was performed by quantitative real-time PCR, and carried out in an Eco Real-Time PCR system (illumina, Inc. SD, USA), using KAPA SYBR FAST mix (KK 4602) and KAPA Taq

DNA Polymerase (Kapa Biosystem, USA). Primers suitable for the amplification of 100–150 bp products for each gene under study were designed using the PRIMER3 software (Table 1 supplement) (Rozen and Skaletsky 2000). The amplification of cDNA was performed under the following conditions: denaturation at 94 °C for 2 min and 40 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s. Three biological replicates with three technical repetitions were performed for each treatment. Transcript levels were calculated by the $\Delta\Delta C_q$ method (Livak and Schmittgen 2001) using *VvUBIQUITIN* as the reference gene. *VvUBIQUITIN* was selected as a reference gene because the transcript level was stable across treatments (Rubio and others 2014).

Statistical Analysis

The depth of bud dormancy was estimated by BR_{50} and the corresponding averages and standard deviations (s.d.) were calculated by mean of the Probit analysis (Minitab 13.31 Minitab Inc, USA). For pairwise comparison, Student's *t* test $\alpha = 0.05$ was used.

Results

Seasonal Variations of Cold Hardiness and Endodormancy in Grapevine Buds

The depth of dormancy measured as BR_{50} and the level of CH measured as LTE were determined in buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless throughout the year 2012 (Fig. 1a). The vines were grown in Santiago, Chile (33°34'S) and daily mean temperatures of the location are shown in Fig. 1b.

Temperature Affects LTE Values Only in Dormant Buds

Significant differences in the values of LTE were detected in cooled (exposed to 5 °C) and non-cooled (exposed to 14 °C) dormant buds. After 3 weeks of exposure to low temperatures, the value of LTE decreased from −15 to −16.5 °C, whereas in buds exposed to ambient temperature the value of LTE increased from −15 to −13 °C. Moreover, the difference among buds exposed to both treatments, increased with the progress of time, and after 6 weeks of treatment, the difference increased from 3 to

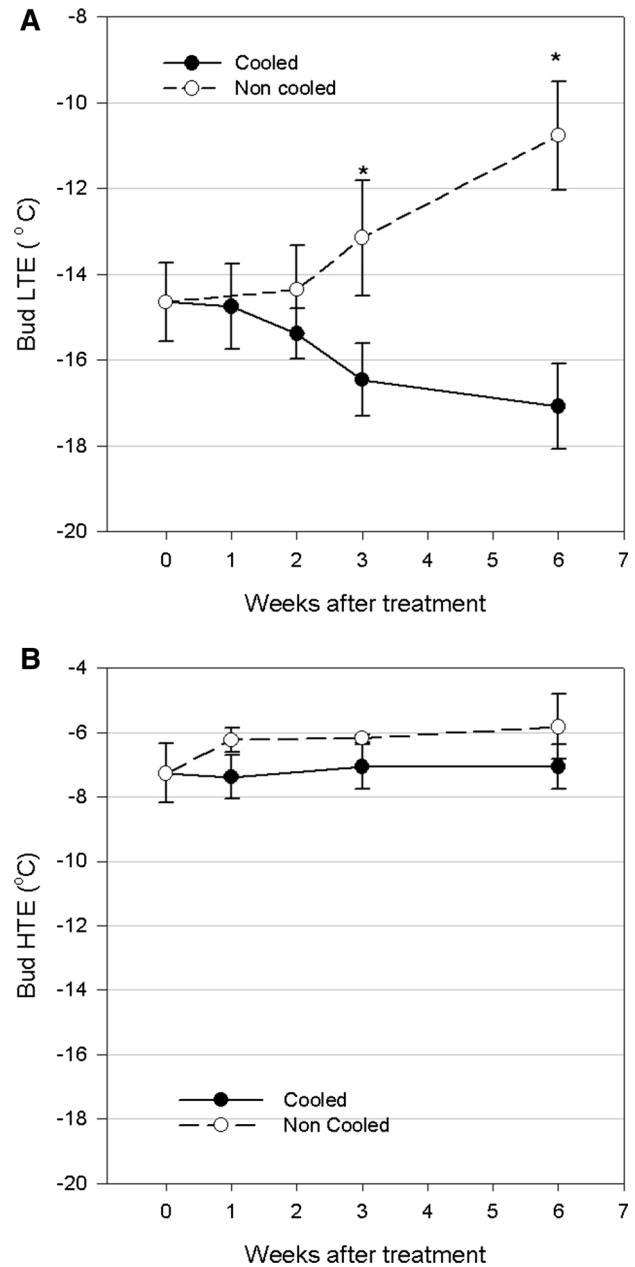


Fig. 2 Cold acclimation and deacclimation of dormant grapevine buds exposed to low (5 °C) and ambient (14 °C) temperatures. **a** Dormant buds with partial cold acclimation were collected on 10 June after being exposed to 200 chilling hours in the field. Cold acclimation was determined by measuring the low-temperature exotherm (LTE) by DTA in single buds over time. **b** Low (5 °C) and ambient (14 °C) temperature effects on the high-temperature exotherm (HTE) in non-dormant buds. Canes were collected on December 27. Values correspond to the average of 12 single and bars represent s.d. and asterisk indicates significant differences (Student's *t* test $\alpha = 0.05$)

6 °C (Fig. 2a). In contrast, in non-dormant buds, a broad large peak was detected at -7 ± 1 °C, which did not vary with the temperatures (Fig. 2b). This peak was interpreted as the result of an overlap between HTE and LTE.

Dormancy and SD-Photoperiod Increase the Thickness of the CW in Meristematic Cells of Grapevine Buds

Significant differences between the thickness of the CW of meristematic cells of dormant (1.4 ± 0.3 μM) and non-dormant buds (0.28 ± 0.1 μM) of *V. vinifera* cv Thompson seedless were observed (Fig. 3c, d). Because SD-photoperiod induces ED in grapevine buds (Fennell and Hoover 1991; Kühn and others 2009; Pérez and others 2009; Grant and others 2013), the effect of photoperiod on the thickening of the CW of meristematic cells of buds of *V. vinifera* cv. Italia melhorada was examined by TEM. After 8 weeks of treatment, significant differences between the thickness of the CW of meristematic cells exposed to SD (0.75 ± 0.1 μM) and LD-photoperiods (0.3 ± 0.05 μM) were observed (Fig. 3a, b).

Photoperiod Regulation of “Cellulose synthase and Laccase” Genes of Grape Buds

All cellulose synthase genes of grapevine buds analyzed were down-regulated by SD-photoperiod. After 8 weeks of treatment, the expression of *VvCSA3* and *VvCSLG* was down-regulated by SD-photoperiod, whereas the expression of *VvCSLE* was down-regulated only after 2 weeks (Table 1). Conversely, the expression of *VvLAC14*, a gene involved in laccase synthesis, was up-regulated by SD-photoperiod, whereas the expression of the other laccase genes analyzed was not affected by photoperiod (Table 1).

Dormancy Increases Starch Accumulation and Low Temperatures Increase Starch Breakdown and Soluble Sugar Content in Dormant Buds

Starch accumulates during the development of ED in grapevine buds, and the levels of starch in non-dormant buds were significantly lower than those found in dormant buds (Fig. 4a). On the other hand, low temperature (5 °C) reduced the content of starch in dormant buds. After

Fig. 3 Electron photomicrographs that illustrate the effect of photoperiod and endodormancy (ED) on the thickening of the cell wall (CW) of meristematic cells in buds of *V. vinifera* L cv. Italia melhorada and cv. Thompson seedless. Photoperiod studies were performed in *V. vinifera* cv. Italia melhorada exposed to **a** LD-photoperiod and **b** SD-photoperiod for 8 weeks. Endodormancy studies were performed in buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless collected on **c** 27 December (non-dormant), and **d** 10 June 2012 (dormant). Scale bars = 2 μM

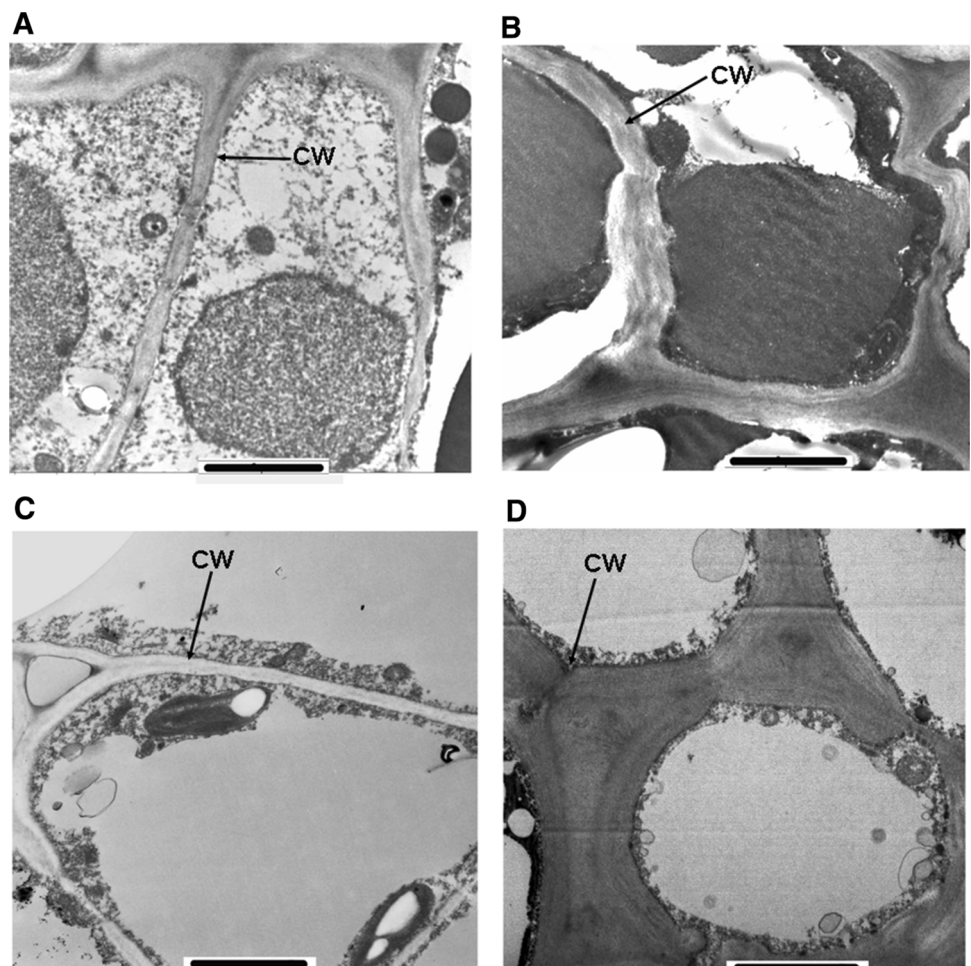


Table 1 Effect of photoperiod on the expression of cellulose synthase *VvCSA3*, *VvCSLE*, *VvCSLG* and laccase *VvLAC7*, *VvLAC9*, *VvLAC14* genes in buds of *Vitis vinifera* cv

Genes	SD-photoperiod		LD-photoperiod	
	2 weeks	8 weeks	2 weeks	8 weeks
<i>VvCSA3</i>	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.3	^a 2.1 ± 0.2
<i>VvCSLE</i>	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2	^a 1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2
<i>VvCSLG</i>	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.4	^a 1.9 ± 0.2
<i>VvLAC7</i>	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.6
<i>VvLAC9</i>	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.6	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.8
<i>VvLAC14</i>	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.3	^a 0.4 ± 0.1

Samples exposed to SD-photoperiod for 2 weeks serve as controls. Values are the average of three biological replicates with three technical repetitions. Italia melhorada after 2 and 8 weeks of treatments

^a Significant differences Student's *t* test $\alpha = 0.05$ and $\pm$ correspond to s.d

3 weeks of exposure to cold, starch content was reduced by 50 mg GFW⁻¹, whereas in buds exposed to ambient temperatures (14 °C) for the same period of time, it was reduced only by 10 mg GFW⁻¹ (Fig. 4b). Accordingly low temperatures increased the content of soluble sugars, sucrose (Suc), glucose (Glc), and fructose (Fru) in dormant buds (Fig. 5).

Effect of Photoperiod and Low Temperatures on the Expression of Dehydrin Genes in Grapevine Buds

The expression of *VvDHN1*, *VvDHN2*, and *VvDHN3*, but not of *VvDHN4* was strongly up-regulated by low temperatures in buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless. Analysis was performed by RT-qPCR after 2 weeks of treatment (Fig. 6a). Conversely, the expression of *VvDHN1*, *VvDHN2*, and *VvDHN3* was down-regulated by SD-photoperiod, whereas the expression of *VvDHN4* was up-regulated in buds of *V. vinifera* cv. Italia melhorada (Fig. 6b).

Discussion

The present study shows that the development of dormancy in grapevine buds is a prerequisite for the acquisition of full CH; whereas bud dormancy is characterized by the thickening of the CW of meristematic cells and starch accumulation, CH is characterized by starch breakdown, soluble sugar accumulation, and up-regulation of dehydrin genes.

Overlapping BR₅₀ and LTE curves of buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless grown in Santiago, Chile revealed

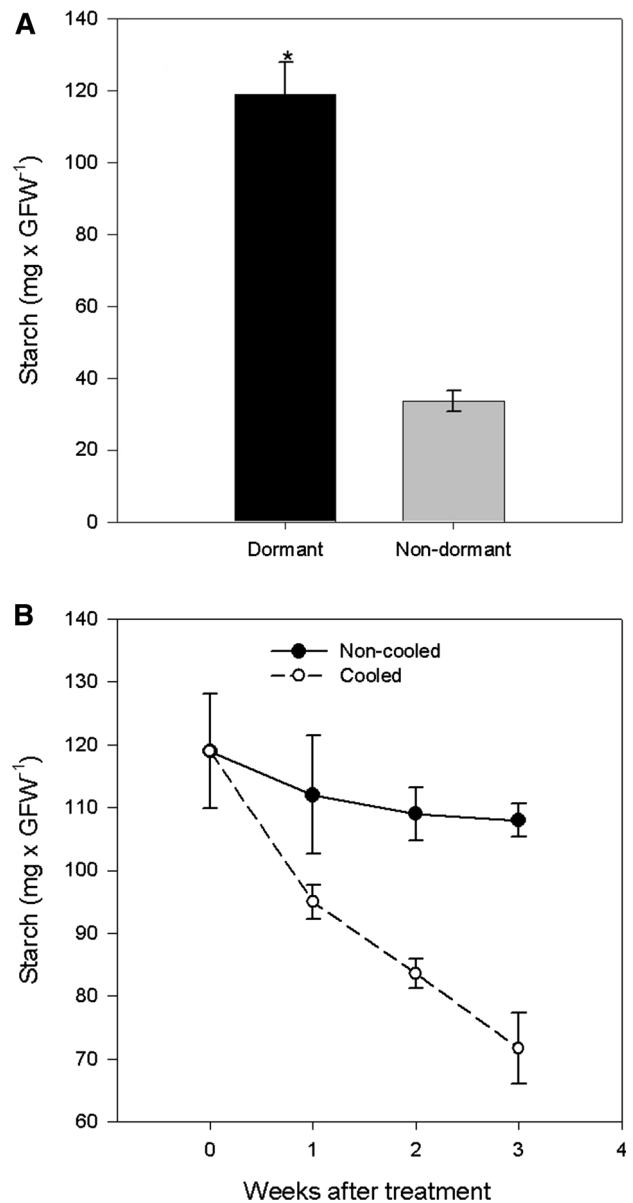


Fig. 4 Effect of dormancy and low temperature on the content of starch in buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless. **a** Starch content was determined in dormant buds (collected on 10 June) and in non-dormant buds (collected on 27 December). **b** Single dormant bud cuttings exposed to ambient (14 °C) (non-cooled) and low temperatures (5 °C) (cooled) were weekly analyzed for starch content for a period of 3 weeks. Values correspond to the average of three biological replicates bars represent s.d. and asterisk indicates significant differences (Student's *t* test $\alpha = 0.05$)

that CH began to develop in late April when buds were fully endodormant. However, these results do not assure whether a relationship exists between CH and ED, because the drop in temperatures, and therefore, the initiation of chilling accumulation could coincide with the stage of ED in this region. To get more insight into the existence of a relationship between dormancy and CH in grapevine buds,

temperature effects on LTE values were studied in dormant and non-dormant buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless. Although the experiments were carried out in single-bud cuttings in the dark, the results indicate that dormant buds can be cold acclimated or deacclimated depending on whether they were exposed to low or ambient temperatures. Conversely, non-dormant buds were not cold acclimated when they were exposed to low temperatures. Interestingly,

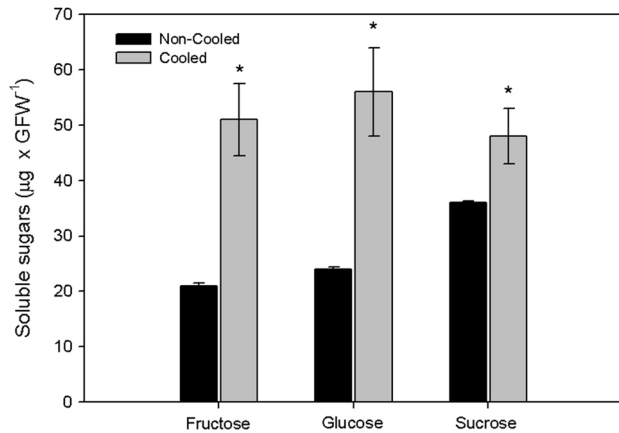


Fig. 5 Effect of low temperature on the accumulation of soluble sugars in buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless. Dormant buds were exposed to low (5 °C) (cooled) and ambient (14 °C) (non-cooled) temperatures for 3 weeks. Soluble sugars were extracted and measured by gas chromatography. Values are the average of three biological replicates and bars correspond to s.d. and asterisk indicates significant differences (Student's *t* test $\alpha = 0.05$)

these results are consistent with reports indicating that the buds of woody perennials cannot cold acclimate when the development of ED is prevented by over-expressing *PHYA* and *FT* genes (Olsen and others 1997; Tränker and others 2010).

Although SD-photoperiod induces ED in grapevine buds (Fennell and Hoover 1991; Kühn and others 2009; Grant and others 2013), its effect on LTE is very low (Grant and others 2013), indicating that CH is mainly induced by low temperatures in grapevine buds. As the thickening of the CW and starch synthesis is associated with ED, and only dormant buds are cold acclimated by low temperatures, it seems likely that CW thickening and starch accumulation that occurs during ED could play a significant role in the subsequent development of CH in dormant buds. The thickening of the CW that is triggered by SD-photoperiod does not involve an increase in the expression of cellulose synthase genes, suggesting that the synthesis of cellulose during ED is not regulated transcriptionally. However, the SD-photoperiod up-regulation of *VvLAC14* suggests that the potential increase in lignin synthesis during ED could be transcriptionally regulated.

A number of roles have been proposed for sugars in freezing tolerance, including osmotic effects (Sakai and Larcher 1987), decrease of ice nucleation point in super-cooled liquid (Gunnink 1989), cryoprotection of proteins and membranes (Ashworth and others 1993), and promotion of glass formation (Levine and Slade 1998). Therefore, it is possible sugars act in several capacities to affect

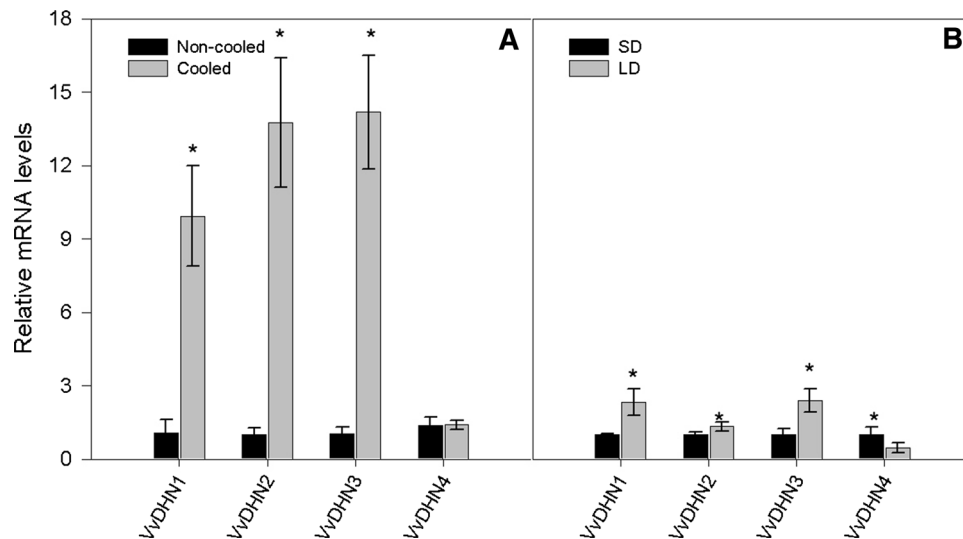


Fig. 6 Effect of low temperature and photoperiod on the expression of dehydrin genes (*VvDHNs*) in grapevine buds. **a** Single-bud cuttings of *V. vinifera* cv. Thompson seedless grapevines exposed to ambient (14 °C) (non-cooled) and low temperatures (5 °C) (cooled) for 2 weeks. **b** *V. vinifera* cv. Italia melhorada exposed to LD and SD-photoperiod for 8 weeks. Transcript levels were determined by RT-qPCR, normalized against *VvUBIQUITIN*. Samples maintained at

ambient temperature 14 °C (non-cooled) serve as controls in low-temperature experiments, and vines exposed to SD-photoperiod serve as controls in the photoperiod experiment. Values are the average of three biological replicates each with three technical repetitions, bars represent s.d. and asterisk indicates significant differences (Student's *t* test $\alpha = 0.05$)

freezing tolerance depending on the tissue or conditions. An increase of total soluble sugars and a decrease in starch content have been observed coincidentally with an increase in freezing tolerance in many plant species (Levitt 1980). In this study, starch accumulation in grape buds was associated with dormancy and starch breakdown and the subsequent increase in sugar content with CH. Interestingly, it has been reported that in *V. amurensis*, a wild grapevine species with remarkable cold tolerance, the expression of genes coding for starch-degrading enzymes such as α -amylases was up-regulated by cold stress (Xin and others 2013). This result was confirmed in *V. vinifera* by Rubio and others (2014), who demonstrated that diverse isogenes coding for α -amylases was up-regulated in dormant buds exposed to low temperatures.

Recently, several studies have shown that the accumulation of dehydrins (DHNs) and other stress proteins plays an important role in the acclimation of woody plants to unfavorable temperatures (Kosova and others 2007). DHNs are a class of hydrophilic, thermostable stress proteins with a high number of charged amino acids that belong to the group II Late Embryogenesis Abundant (LEA) family. Genes that encode these proteins are expressed during late embryogenesis, as well as in vegetative tissue subjected to drought, low-temperature and high-salt conditions (Nylander and others 2001). Four dehydrin genes were identified in the genome of *V. vinifera* (*VvDHNs*), two belonging to YnSKn type *VvDHNs* (*VvDHN1*, *VvDHN4*), and two to SKn type *VvDHNs* (*VvDHN2*, *VvDHN3*), and their expression pattern and stress response varied between them (Yang and others 2012). In this study, low temperatures up-regulated, whereas SD-photoperiod down-regulated the expression of *VvDHN1*, *VvDHN2*, and *VvDHN3*. Because, SD-photoperiod induces ED and low temperatures induce CH in grapevine buds, it is likely that these cold-induced *VvDHNs* are associated with the acquisition of CH. Interestingly, it has been reported that *V. riparia* (*VrDHN1*) protects lactate dehydrogenase (LDH) from freeze-thaw damage more effectively than bovine serum albumin (BSA), a protein with a known cryoprotective function (Hughes and Graether 2011; Hughes and others 2013). In other woody perennials, DHN expression has been associated with both ED and CH. In blueberry, DHN proteins accumulate during cold acclimation and a relationship between the abundance of DHNs and CH has been established (Arora and others 1997). In birch (*Betula pubescens*), SD-photoperiod and low temperature induce the expression of *BPuDHN1*, whereas *BPuDHN2* was exclusively induced by low temperatures (Welling and others 2004). The potential significance of DHNs in the acquisition of CH lies in the fact that plant cells undergo dehydration during freezing stress due to the presence of ice in extracellular spaces (Levitt 1980).

Acknowledgments The financial support of FONDECYT Project 1140318 is gratefully acknowledged.

References

- Arora R, Rowland LJ, Panta GR (1997) Chill-responsive dehydrins in blueberry: are they associated with cold-hardiness or dormancy transitions? *Physiol Plant* 101:8–16
- Ashworth EN, Stirn VE, Volenec J (1993) Seasonal variations in soluble sugars and starch within woody stems of *Cornus sericea* L. *Tree Physiol* 13:379–388
- Badulescu R, Ernst M (2006) Changes of temperature exotherms and soluble sugar in grapevine (*Vitis vinifera* L) buds during winter. *J Appl Bot Food Qual Angew Bot* 80:165–170
- Burke MJ, Gusta LV, Quamme HA, Weiser CJ, Li PH (1976) Freezing and injury in plants. *Ann Rev Plant Physiol* 27:507–528
- Chang S, Puryear J, Cairney JA (1993) Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11:113–116
- Dennis FG (2003) Problems in standardizing methods for evaluating the chilling requirements for the breaking of dormancy in buds of woody plants. *Hortic Sci* 38:347–350
- Fennell A, Hoover E (1991) Photoperiod influences growth, bud dormancy and cold acclimation of *Vitis labruscana* and *V. riparia*. *J Am Soc Hortic Sci* 116:270–273
- Ferguson JC, Tarara JM, Mills LJ, Grove GG, Keller M (2011) Dynamic thermal time model of cold hardiness for dormant grapevine buds. *Ann Bot* 107:389–396
- Ferguson JC, Moyer MM, Mills LJ, Hoogenboom G, Keller M (2014) Modeling dormant bud cold hardiness and bud-break in twenty-three *Vitis* genotype reveals variation by region of origin. *Am J Enol Vitic* 65:59–71
- Grant TNL, Gargrave J, Dami IE (2013) Morphological physiological, and biochemical changes in *Vitis* genotype in responses to photoperiod regimes. *Am J Enol Vitic* 64:466–475
- Gunnink BW (1989) Critical analysis of conductometric phase transition porosimetry: i Capillary freezing and melting. *Part Sci Technol* 7:229–239
- Gusta LV, Wisniewski M (2013) Understanding plant cold hardiness: an opinion. *Plant Physiol* 147:4–14
- Hamman RA, Dami IE, Walsh TM, Stushnoff C (1996) Seasonal carbohydrate changes and cold hardiness of chardonnay and riesling grapevines. *Am J Enol Vitic* 47:31–36
- Hansen J, Moller IB (1975) Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Anal Biochem* 68:87–94
- Hughes S, Graether SP (2011) Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin proteins. *Prot Sci* 20:42–50
- Hughes S, Schart V, Malcomson J, Hogarth KA, Martynowicz DM, Tralman-Baker E, Patel SN, Graether SP (2013) The importance of size and disorder in the cryoprotective effects of dehydrins. *Plant Physiol* 163:1376–1386
- Jian L, Li PH, Sun L, Chen TH (1997) Alterations in ultrastructure and subcellular localization of Ca^{2+} in poplar apical bud cells during the induction of dormancy. *J Exp Bot* 48:1195–1207
- Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT (2007) The role of dehydrins in plant response to cold. *Biol Plant* 51:601–617
- Koussa T, Broquedis M, Bouard J (1994) Changes of abscisic acid level during the development of grape latent buds, particularly in the phase of dormancy break. *Vitis* 33:63–67
- Kühn N, Ormeño J, Jaque-Zamora G, Pérez FJ (2009) Photoperiod modifies the diurnal expression profile of *VvPHYA* and *VvPHYB* transcript in field-grown grapevines. *J Plant Physiol* 166:1172–1180

- Lang GA (1987) Dormancy: a new universal terminology. *Hortic Sci* 22:817–820
- Levine H, Slade L (1980) Thermomechanical properties of small carbohydrates-water glasses and rubbers. *J Chem Soc Faraday Trans* 184:2619–2633
- Levitt J (1980) Freezing and high temperature stresses. Response of plants to environmental stresses, vol I. Academic Press, New York, pp 497–512
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 25:402–408
- Mills LJ, Ferguson JC, Keller M (2006) Cold-hardiness evaluation of grapevine buds and cane tissues. *Am J Enol Vitic* 57:194–200
- Noriega X, Burgos B, Pérez FJ (2007) Short-day photoperiod triggers and low temperature increase expression of peroxidase RNA transcripts and basic peroxidase isoenzyme activity in grapebuds. *Phytochemistry* 68:1376–1383
- Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 45:263–279
- Olsen JE, Junttila O, Nilsen J, Eriksson M, Martinussen I, Olsson O, Sandberg G, Moritz T (1997) Ectopic expression of phytochrome A in hybrid aspen changes critical day-length for growth and prevents cold acclimatization. *Plant J* 12:1339–1350
- Pérez FJ, Rubio S, Ormeño-Núñez J (2007) Is erratic bud-break in grapevines grown in warm winter areas related to disturbance in mitochondrial respiratory capacity and oxidative metabolism? *Funct Plant Biol* 34:624–632
- Pierquet P, Stushnoff C (1980) Relationship of low temperature exotherms to cold injury in *Vitis riparia* Michx. *Am J Enol Vitic* 31:1–6
- Pierquet P, Stushnoff C, Low Burke MJ (1977) Temperature exotherms in stem and bud tissues of *Vitis riparia* Michx. *J Am Chem Soc Hortic Sci* 102:54–55
- Rinne PLH, Kaikuranta P, Van der Schoot C (2001) The shoot apical meristem restores its symplastic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant J* 26:249–264
- Rohde A, Bhalerao RP (2007) Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Sci* 12:217–223
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–386
- Rubio S, Donoso A, Pérez FJ (2014) The dormancy-breaking stimuli “chilling, hypoxia and cyanamide exposure” up-regulate the expression of α -amylase genes in grapevine buds. *J Plant Physiol* 171:373–381
- Sakai A, Larcher W (1987) Frost survival of plants: Responses and adaptations to freezing stress. Ecological studies, vol 62. Springer, Berlin
- Salzman RA, Bressan RA, Hasegawa PM, Ashworth EN, Bordelon BP (1996) Programmed accumulation of LEA-like protein during desiccation and cold acclimation of overwintering grape buds. *Plant Cell Environ* 19:713–720
- Sreekantan L, Mathiason K, Grimplet J, Schlauch K, Dickerson JA, Fennell AY (2010) Differential floral development and gene expression in grapevines during long and short photoperiods suggests a role for floral genes in dormancy transitioning. *Plant Mol Biol* 73:191–205
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571–599
- Tränker C, Lehmann S, Hoenicka H, Hanke M, Fladung M, Lenhardt D, Dunemann F, Gau A, Schlangen K, Malnoy M, Flachowsky H (2010) Over-expression of an FT homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232:1309–1324
- Vergara R, Pérez FJ (2010) Similarities between natural and chemically induced bud-endodormancy release in grapevine *Vitis vinifera* L. *Sci Hortic* 125:648–653
- Wake CMF, Fennell A (2000) Morphological, physiological and dormancy response of three *Vitis* genotypes to short photoperiod. *Physiol Plant* 109:203–210
- Welling A, Rinne P, Viherä-Aamio Kontunen-Soppela S, Heino P, Palva ET (2004) Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). *J Exp Bot* 55:507–516
- Wolf TK, Cook MK (1994) Cold hardiness of dormant buds of grape cultivars: comparison of thermal analysis and field survival. *Hortic Sci* 29:453–455
- Xin H, Zhu W, Wang L, Xiang Y, Fang L, Li J, Sun X, Wang N, Londo JP, Li S (2013) Genome wide transcriptional profile analysis of *Vitis amurensis* and *V. vinifera* in response to cold stress. *PLoS One* 8(3):e5870
- Yang Y, He M, Zhu Z, Li S, Xu Y, Zhang C, Singer SD, Wang Y (2012) Identification of dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biol* 12:140–148

APÊNDICE B

Relationship between endodormancy, FLOWERING LOCUS T and cell cycle genes in *Vitis vinifera*

Relationship between endodormancy, *FLOWERING LOCUS T* and cell cycle genes in *Vitis vinifera*

Ricardo Vergara^{1,2} · Ximena Noriega¹ · Francisca Parada¹ · Débora Dantas³ · Francisco J. Pérez¹

Received: 27 July 2015 / Accepted: 22 September 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Main conclusion In grapevines, the increased expression of *VvFT*, genes involved in the photoperiodic control of seasonal growth (*VvAPI*, *VvAIL2*) and cell cycle genes (*VvCDKA*, *VvCDKB2*, *VvCYCA1*, *VvCYCB*, *VvCYCD3.2*) in the shoot apex relative to the latent bud, suggests a high mitotic activity of the apex which could prevent them to enter into endodormancy. Additionally, the up-regulation of these genes by the dormancy-breaking compound hydrogen cyanamide (H_2CN_2) strongly suggests that *VvFT* plays a key role in regulating transcriptionally cell cycle genes.

At the end of the growing season, short-day (SD) photoperiod induces the transition of latent grapevine buds (*Vitis vinifera* L) from paradormancy (PD) to endodormancy (ED), which allows them to survive the cold temperatures of winter. Meanwhile, the shoot apex gradually decreases its growth without entering into ED, and as a

result of the fall of temperatures at the beginning of autumn, dies. To understand developmental differences and contrasting responses to environmental cues between both organs, the expression of cell cycle genes, and of genes involved in photoperiodic control of seasonal growth in trees, such as *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), *APETALA1* (*API*) and *AINTEGUMENTA-like* (*AIL*) was analyzed at the shoot apex and latent buds of vines during the transition from PD to ED. After shift to SD photoperiod, increased expression of cell cycle genes in the shoot apex suggests a high mitotic activity in this organ which could prevent them from entering into ED. Additionally, the increased expression of *VvFT*, *VvAPI* and *VvAIL2* in the shoot apex, and the up-regulation of *VvFT*, *VvAPI* and cell cycle genes *VvCDKA*, *VvCDKB2*, *VvCYCA.1*, by the dormancy-breaking compound hydrogen cyanamide (H_2CN_2), strongly suggests that *VvFT* plays a key role in regulating transcriptionally cell cycle genes, giving thus, more support to the model for photoperiodic control of seasonal growth in trees. Furthermore, downregulation of *VvFT* by the SD photoperiod detected in leaves and buds of grapevines highlights the importance of *VvFT* in the induction of growth cessation and in ED development, probably by regulating the expression of cell cycle genes.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00425-015-2415-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Francisco J. Pérez
frperez@uchile.cl

- ¹ Facultad de Ciencias, Laboratorio de Bioquímica Vegetal, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile
- ² Programa Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile
- ³ Centro de Ciencias e Tecnologías Agropecuarias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Avda Alberto Lamego 2000, Campos Dos Goytacazes, RJ, Brazil

Keywords Apex · Buds · Dormancy · Grapevines

Abbreviations

<i>AIL</i>	<i>AINTEGUMENTA-like</i>
<i>API</i>	<i>APETALA1</i>
<i>CDK</i>	Cyclin-dependent kinase
<i>ED</i>	Endodormancy
<i>FT</i>	<i>FLOWERING LOCUS T</i>
<i>PD</i>	Paradormancy
<i>SD</i>	Short day

Introduction

In contrast to poplar and other tree species, *Vitis* does not set a terminal bud in response to short day (SD) photoperiod signal, and the shoot apex does not enter into endodormancy (ED) nor cold acclimates, as a result growth always terminates by the death of the shoot apex after the fall of the temperatures at the beginning of autumn; however, upon reaching a critical day length (CDL), other hallmark phenotypes such as periderm development, growth cessation and development of bud ED are induced (Fennell and Hoover 1991; Wake and Fennell 2000; Sreekantan et al. 2010; Grant et al. 2013). The shoot apex, through apical dominance inhibits the outgrowth of latent buds in woody perennial plants (Crabbé 1984; Suzuki 1990; Blazková et al. 1999) and this phase of bud development is termed paradormancy (PD) (Lang 1987). Recently, in *V. riparia* it has been shown that the shoot apex, summer lateral buds and leaves in addition to node position, contribute to the inhibition of latent bud outgrowth during PD (He et al. 2012). In *Populus*, the CO/FT module plays a central role in sensing the SD photoperiod signal, and the rapid down-regulation of *FLOWERING LOCUS T (FT)* expression after the perception of the SDs signal is a key event in the induction of growth cessation and ED establishment (Böhlenius et al. 2006). In *V. vinifera*, *VvFT* is downregulated during ED (Díaz-Riquelme et al. 2012) and is up-regulated naturally prior to bud-break, and by hypoxia (Vergara et al. 2012). Downstream of the CO/FT module, the *AINTEGUMENTA-like 1 (AIL1)* transcription factor is the target of the SDs signal (Resman et al. 2010; Karlberg et al. 2011). Because *AIL1* and related transcription factors are positive regulators of the expression of core cell cycle genes, the repression of *AIL1* expression by SDs results in the cessation of growth (Mizukami and Fischer 2000; Karlberg et al. 2011). Recently, in hybrid aspen the MAD-box transcription factor called *Like-API (LAPI)*, which is highly similar to the *Arabidopsis* floral identity gene *APETALA 1 (API)* was identified as the target of *FT* which mediates the regulation of *AIL1* expression; this finding led to a model for the photoperiodic control of seasonal growth in trees (Azeez et al. 2014). Recently, Tylewicz et al. (2015) showed that the interaction of FT with FD is crucial for the transcriptional regulation of *LAPI* in hybrid aspen. In order to test whether the module CO/FT mediates the induction of ED by SD photoperiod, and to analyze the role of this module in the absence of ED at the shoot apex, the effect of SD photoperiod on *VvFT* expression was analyzed in leaves and latent buds of vines. In addition, the expression of cell cycle genes (CCG) and genes involved in the model for photoperiodic control of seasonal growth (*VvFT*, *VvAPI*

and *VvAIL*) was analyzed at the shoot apex and latent buds during the transition from PD to ED. Finally, in order to get more insight in the possible regulation of cell cycle genes by *VvFT*, the effect of the dormancy-breaking compound hydrogen cyanamide (H_2CN_2) on the expression of *VvFT*, *VvAPI*, *VvAIL2* and CCG was analyzed in dormant grapevine buds.

Materials and methods

Gene expression analysis at the shoot apex and latent buds of grapevines

Eight-year-old *Vitis vinifera* cv. Thompson seedless grown at the experimental station of the Chilean National Institute of Agriculture Research (INIA) in Santiago, Chile (33°34'S latitude) were used as plant material for gene expression analyses. Latent buds and shoot apex were harvested on the same dates; samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. Samples were harvested between December 27 and March 7 because it has been previously reported that in this grape cultivar grown at the same location, the transition from PD to ED occurs in mid-January (Kühn et al. 2009).

Photoperiod treatments

In a collaborative project with colleagues from Brazil, the effect of different photoperiod regimes on the expression of *VvFT* was performed. Photoperiod experiments were carried out in Messoró, Brazil due to small variations in photoperiod and temperature in the area, making it easier to conduct this type of experiments. Cuttings of *V. vinifera* cv. Italia melhorada on rootstock IAC 572 grown at the Federal University of Rural Semi-Arid (UFERSA), located in Messoró, Brazil (5°12'16"S), where the natural photoperiod during the whole year is (12/12 h day/night) and temperature fluctuates between 29 and 31 °C, were used as plant material for photoperiod experiments (3 replicates per treatment). Rooted cuttings (15 per treatment) were planted into mix 1:1:1 (by vol.) soil, sand and muck in 5 L pots. As growth commenced, one shoot was allowed to develop on each cutting. Cuttings having uniform growth with 12–16 leaves were selected and randomly assigned to each photoperiod treatment for 8 weeks. Photoperiod experiments were conducted in a greenhouse under LD (14/10 h day/night) and SD photoperiod (10/14 h day/night), since the critical day length (CDL) for dormancy transition in *V. vinifera* is about 13 h (Kühn et al. 2009). Supplemental light was provided automatically in the afternoon at 17:30 h using 100 W fluorescent tube; light restriction was

imposed with black plastic sheet in the early morning at 5:30 h. After the treatments, buds were lyophilized for gene expression analysis.

Hydrogen cyanamide treatments

Canes of grapevines cv. Thompson seedless collected at the state of ED (28 April 2015) (Kühn et al. 2009) were used to prepare two groups of 30 single-node cuttings each (10× replicate). One group was sprayed with 2.5 % (w/v) hydrogen cyanamide (Sigma-Aldrich) and the other with tap water and served as control. The treated cuttings were mounted in polypropylene sheet and floated in water in a plastic tray which was placed in a growth chamber (LGC-5201, Daihan labtech CO, Ltda. Korea) set at 23 ± 2 °C under 14 h light (forcing conditions). Samples were retired after 24 and 48 h of treatments and total RNA for gene expression analysis was extracted immediately.

RNA purification and cDNA synthesis

For gene expression analysis in different organs of grapevines, total RNA was isolated and purified from the latent buds (0.5–0.7 g⁻¹FW) and shoot apex (0.1 g⁻¹FW) of *Vitis vinifera* cv Thompson seedless. For photoperiod experiments total RNA was isolated from lyophilized leaves and buds (0.05–0.1 g) of *V. vinifera* cv. Italia melhorada. In both cases, total RNA was extracted and purified using a modification of the method of Chang et al. (1993), as described in Noriega et al. (2007). DNA was removed by treatment with RNAase-free DNase (1 U/μg) (Thermo Scientific) at 37 °C for 30 min. First-strand cDNA was synthesized from 1 μg of purified RNA with 1 μL oligo(dT)_{12–18} (0.5 μg μL⁻¹) as primer, 1 μL dNTP mix (10 mM) and Superscript[®] II RT (Invitrogen).

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR was carried out in an Eco Real-Time PCR system (Illumina) using KAPA SYBR FAST mix (KK 4602) qPCR Master Mix (2×). Primers suitable for the amplification of 80–200 bp products from each of the genes being studied were designed using PRIMER3 software (Rozen and Skaletsky 2000) (Suppl. Table S1), primers for *VvFT* have been described previously (Vergara et al. 2012). cDNA was amplified under the following conditions: denaturation at 94 °C for 2 min and 40 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s. Relative changes in gene expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001). Each reaction was performed in at least three biological replicates, each with three technical replicates, and

VvUBIQUITIN was used as a reference gene for normalization.

Results

VvFT is down-regulated by SD photoperiod

In grapevine latent buds, the transition from PD to ED is triggered by SD photoperiod (Kühn et al. 2009; Grant et al. 2013) and the expression of *VvFT* is down-regulated during ED (Díaz-Riquelme et al. 2012). In order to verify whether *VvFT* is down-regulated by SD photoperiod, we analyzed throughout the entire day the expression of *VvFT* in both, leaves and buds of grapevines cv. Italia melhorada after 8 weeks of exposure to LD photoperiod (14/10 h day/night) and SD photoperiod (10/14 h day/night). Results showed significant variations in the expression of *VvFT* throughout an entire day in leaves (Fig. 1b) and buds (Fig. 1a) of grapevines. Under LD conditions, the level of *VvFT* peaked earlier in the buds (at dusk) than in leaves (at night). Under SD conditions, *VvFT* in both leaves and buds, remained at lower levels than under LD conditions throughout the entire day, and no clear peak was observed in both organs (Fig. 1a, b).

VvFT, *VvAPI* and *VvAIL2* are expressed more in the shoot apex than in latent buds during the transition from PD to ED

In order to analyze whether the genes involved in the photoperiodic control of seasonal growth are responsible for the different behavior of the shoot apex and latent bud, the expression levels of these genes were compared in both organs. A single sequence coding for *VvFT* (GSVIVT00012870001) and for *VvAPI* (GSVIVT01012250001) and nine genes belonging to subgroup *AINTEGUMENTA* (*AI*) or *AINTEGUMENTA-like* (*AIL*) of the *APETALA 2* family were identified in the genome of *V. vinifera* GENOSCOPE (<http://www.genoscope.cns.fr>). Three of these genes *VvAI* (GSVIVT01007388001), *VvAIL1* (GSVIVT01009293001) and *VvAIL2* (GSVIVT01016764001) belong to the same clade that *Arabidopsis AINTEGUMENTA* (at4g37750) (Suppl. Fig. S1). Gene expression analysis carried out by qRT-PCR revealed that the expression level of *VvFT* is about tenfold higher in the shoot apex than in latent buds, and as expected, its expression level decreased in both organs with the transition from PD to ED (Fig. 2a). Of the three floral related genes acting downstream of *VvFT*, only *VvAPI* were expressed differently in both organs. Transcript abundance of *VvAPI* was significantly higher at the shoot apex than at the latent bud (Fig. 2b), while the other floral related genes *VvSOC1* and *VvLFY* did not exhibit a

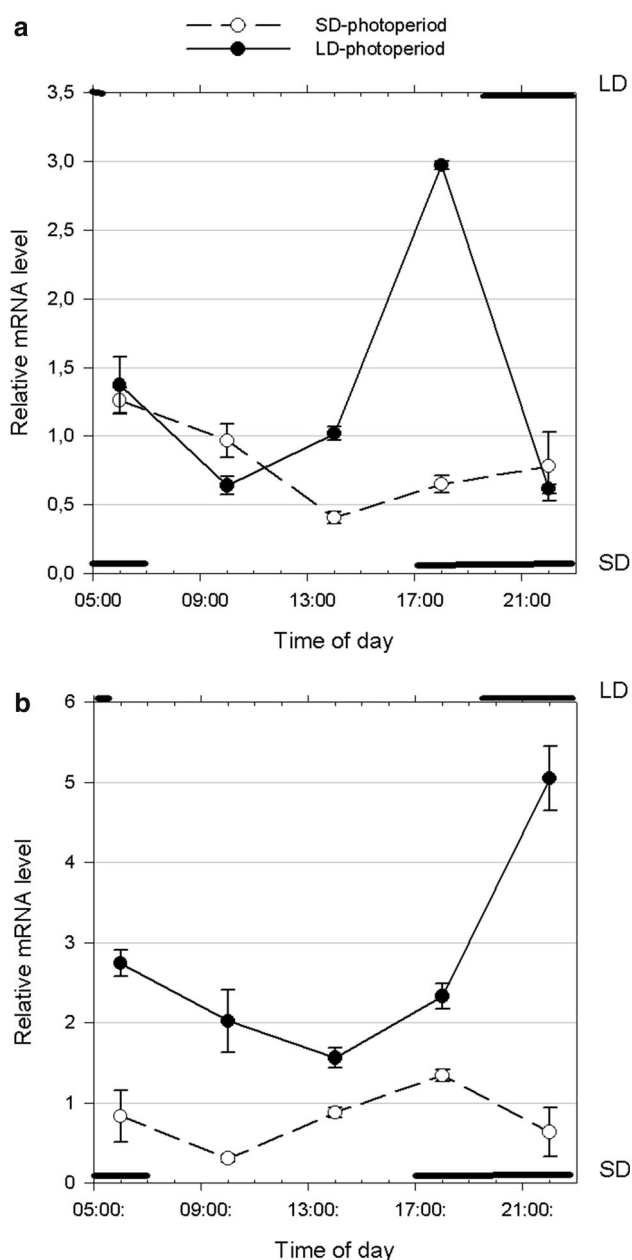


Fig. 1 Effect of LD photoperiod (14/10 h day/night) and SD photoperiod (10/14 h day/night) on the expression of *VvFT* in buds (a) and leaves (b) of *V. vinifera* cv. Italia melhorada after 8 weeks of treatment. Gene expression analysis was performed by qRT-PCR normalized against *VvUBIQUITIN*. Values are expressed relative to samples collected at 6 a.m., and correspond to the average of three biological replicates with three technical repetitions $\pm$ SD

different expression level between both organs (results not shown). The expression of *VvAIL2* was significantly higher in the shoot apex than in the latent bud (Fig. 2c), while *VvAI* expressed slightly more in the shoot apex than in the latent bud and *VvAIL1* did not exhibit differential expression between both organs (results not shown).

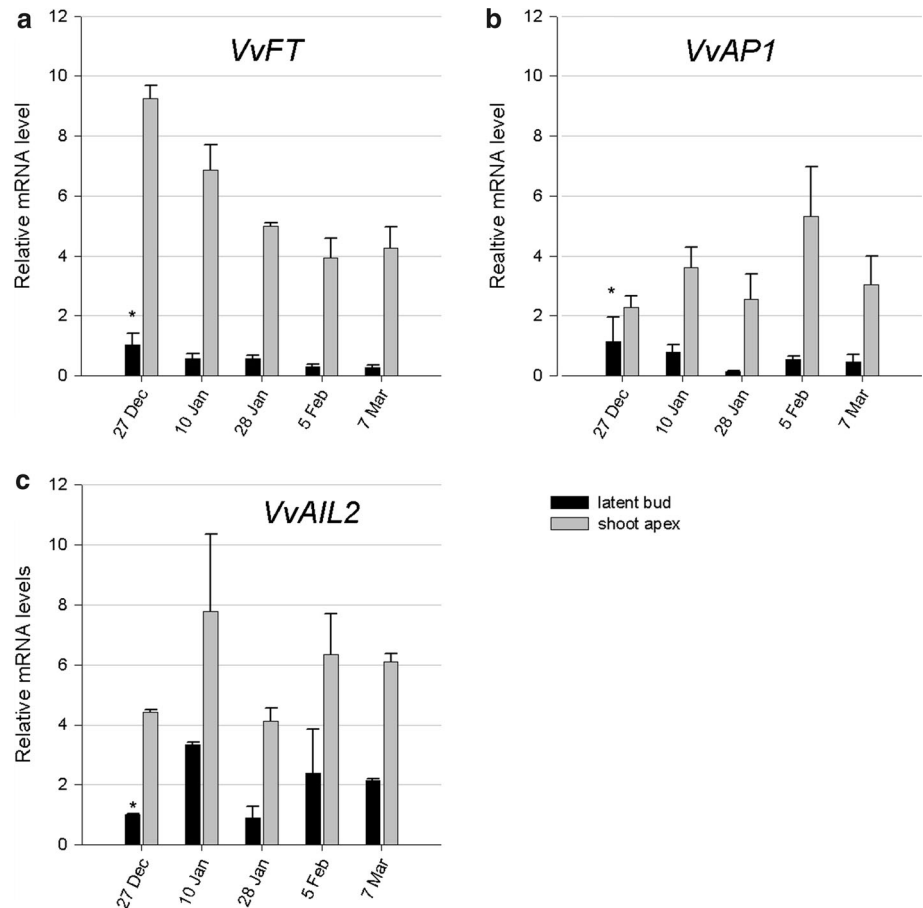
Cell cycle genes are expressed more in the shoot apex than in latent buds of grapevines during the transition from PD to ED

Bioinformatics analyses of the public database of *V. vinifera* allowed the identification of one gene coding for cyclin-dependent kinase A *VvCDKA* (GSVIVT01026700001) and one for type B2-cyclin-dependent kinase, *VvCDKB2* (GSVIVT01013440001). Expression analysis of *VvCDKA* in the shoot apex and in latent buds of vines showed similar expression levels, and no significant differences were detected during transition into ED in both organs (Fig. 3a). In contrast, the expression level of *VvCDKB2* was significantly higher at the shoot apex than at the latent bud, and transcript abundance increased with transition into ED especially in the shoot apex (Fig. 3b). Cyclins genes *VvCYCA1* (GSVIVT01008823001), *VvCYCB* (GSVIVT01023978001) and in a lesser extent *VvCYCD3.2* (GSVIVT01030175001) were also expressed more in the apex than in the latent bud (Fig. 3c–e); however, contrasting with the above results, the cyclin-dependent kinase inhibitor *VvICK5* (GSVIVT01021078001) expressed more in the latent bud than in the shoot apex (Fig. 3f).

Hydrogen cyanamide up-regulated the expression of *VvFT*, *VvAPI* and cell cycle genes in grapevine buds

As a way to get more insight on *VvFT* relationship with ED and with cell cycle genes, the effect of hydrogen cyanamide (H_2CN_2), a compound widely used for the release of ED in grapevines (Or 2009), on the expression of *VvFT* and genes downstream in the signaling cascade for the photoperiodic control of seasonal growth in trees (*VvAPI*, *VvAIL*) and cell cycle genes was analyzed in grapevine buds. In grapevine buds, H_2CN_2 treatment increased significantly the expression of *VvFT* 24 and 48 h after treatment (Fig. 4a). The expression of *VvAPI* increased significantly only 48 h after treatment (Fig. 4b), while the expression of *VvAIL2* showed no major differences with respect to the control (Fig. 4c). On the other hand, the expression of the two cyclin-dependent kinases *VvCDKA* and *VvCDKB2* was up-regulated by H_2CN_2 48 h after treatment (Fig. 5a, b). Of the three cyclins analyzed, only *VvCYCA1* (Fig. 5c) increased its expression after treatment, while *VvCYCB* expression was downregulated 24 h after treatment (Fig. 5d) and *VvCYD3.2* expression was downregulated 48 h after treatment (Fig. 5e). It is interesting to remark that H_2CN_2 treatments showed no effect on *VvAIL2* and on *VvICK5* gene expression.

Fig. 2 Expression analysis of genes related with photoperiodic regulation of seasonal growth at the shoot apex and at the latent bud of *V. vinifera* cv. Thompson seedless during the transition from PD to ED. Gene expression analysis was performed by qRT-PCR normalized against *VvUBIQUITIN*. Values are referred to control sample marked with (asterisk), and are the average of three biological replicates with three technical repetitions $\pm$ SD

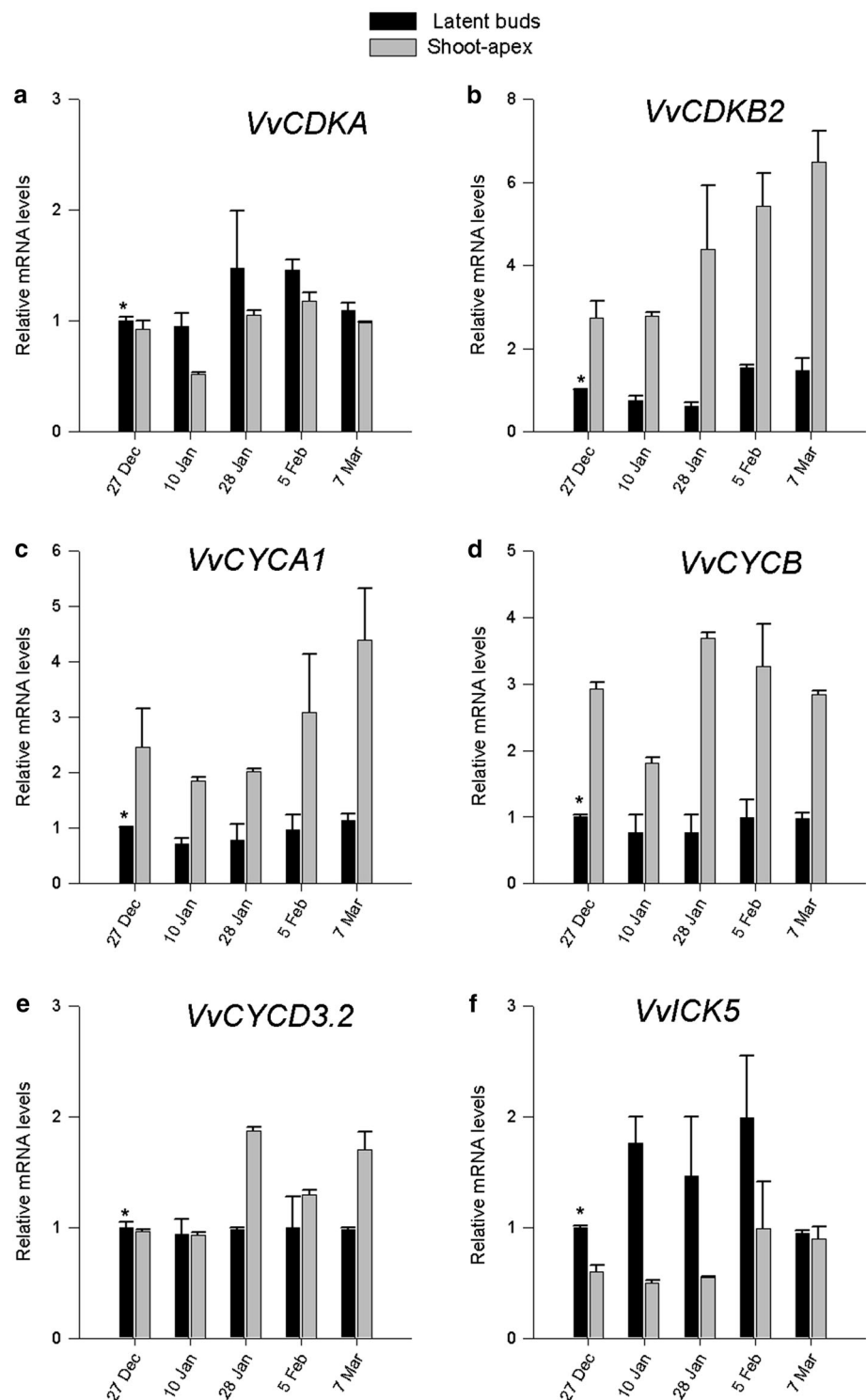


Discussion

Apical meristems are specialized regions found at the extremity of the stem and root, where cells remain in a non-differentiated state and have the potential to proliferate indefinitely (Gegas and Doonan 2006). Axillary and adventitious meristems are also major participants in the control of the overall plant form, but their outgrowth is controlled in various ways including the arrest of development and dormancy. In *Vitis vinifera*, both organs the shoot apex and the latent bud contain a meristem; nevertheless, the behavior of the meristem differs depending on the organ. In the latent bud, as a result of the shortening of day length in late summer, the meristematic cell division stops and the buds enter into a recess period or ED (Kühn et al. 2009; Grant et al. 2013), while in the shoot apex, the meristematic cell division continues and stops gradually with the onset of decreasing temperatures in autumn, and finally dies without entering into ED. In *Populus*, growth arrest of terminal bud is the first event in the process of initiation of ED in response to shortening photoperiods (Rohde and Bhalerao 2007; Petterle et al. 2013), and the same module that controls the photoperiodic flowering of

Arabidopsis (CO/FT) is likely to be responsible for growth cessation in *Populus* (Böhlenius et al. 2006; Horvath 2009). Moreover, the rapid down-regulation of *FT* after perception of SD is a key event in the induction of growth cessation and ED development in *Populus* (Böhlenius et al. 2006). Recently, a model which provides insights into the molecular mechanism from SD photo-perception to growth arrest and ED development by inactivation of cell growth regulators has been proposed in hybrid aspen (Azeez et al. 2014). In this model, *FT* responds to photoperiod signals and through the mediation of *API* and *AIL* genes regulates cell cycle genes which control cell division activity and growth. In *V. vinifera* as in *Populus*, SD photoperiod downregulated the expression of *VvFT*, indicating that a similar signal cascade that integrates photoperiod signals with growth cessation and dormancy development could operate in both species. The greatest expression of *VvFT*, *VvAP1* and *VvAIL2* at the shoot apex is consistent with an increased mitotic activity of this organ. Therefore, this result could explain the different responses of both organs to SD photoperiod, because when *VvFT* level is high, as in the shoot apex, growth cessation is hindered because the level of *VvFT* is not low enough. Conversely, when *VvFT*

Fig. 3 a–f Expression analysis of cell cycle genes at the shoot apex and at the latent buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless during the transition from PD to ED. Gene expression analysis was performed by qRT-PCR normalized against *VvUBIQUITIN*. Values are referred to control sample marked with (*asterisk*), and are the average of three biological replicates with three technical repetitions $\pm$ SD

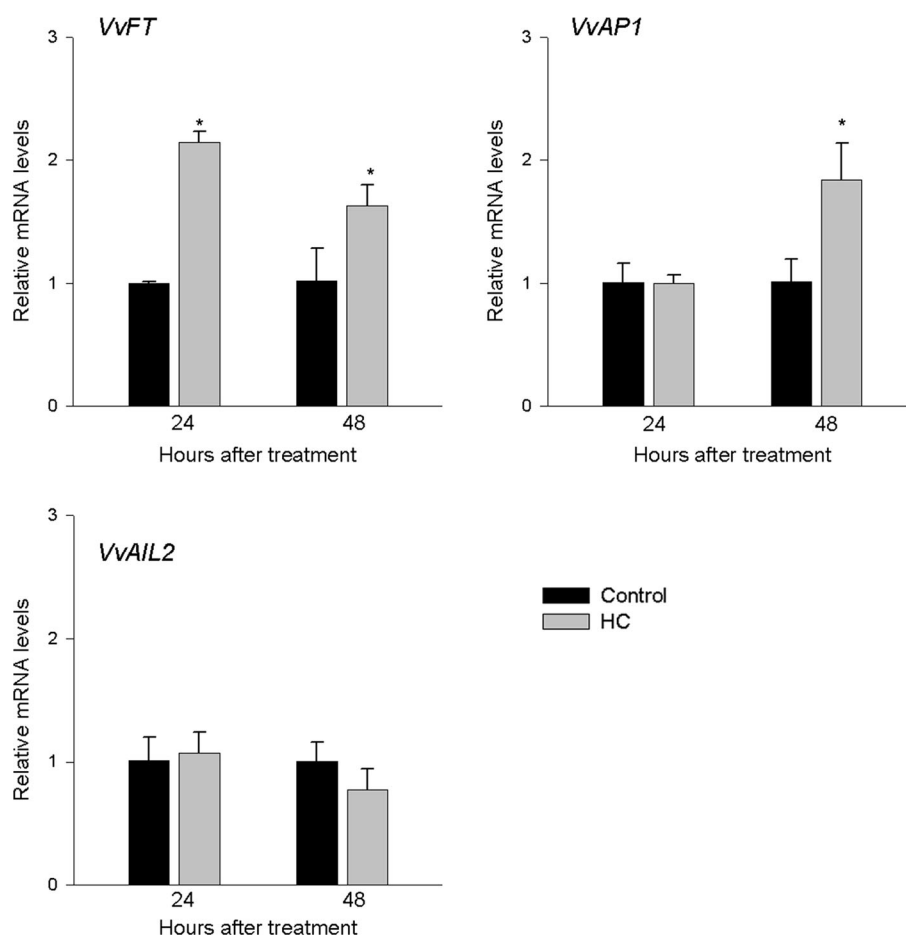


level is low, as in the latent buds, SD photoperiod induce growth cessation and ED and *VvFT* are not detectable during this period.

Plants contain two main types of cyclin-dependent kinase (CDK) involved in primary control of the mitotic cell cycle, the CDKA which is equivalent and

functionally interchangeable with CDK1, the CDK of yeast and animals (Joubés et al. 2000), and the CDKB which is present in higher plants in two sub-types called CDKB1 and CDKB2. The remarkable feature of the *CDKB* genes is that they are expressed only in mitotic cells, from the S-phase until the M-phase of the cell

Fig. 4 Effect of hydrogen cyanamide (H_2CN_2) on the expression of genes related with photoperiodic regulation of seasonal growth in dormant buds of *V.vinifera* cv. Thompson seedless. Gene expression analysis was performed 24 and 48 h after treatments by qRT-PCR normalized against *VvUBIQUITIN*. Values are the average of three biological replicates with three technical repetitions $\pm$ SD (asterisk) Student's *t* test ($\alpha = 0.05$)

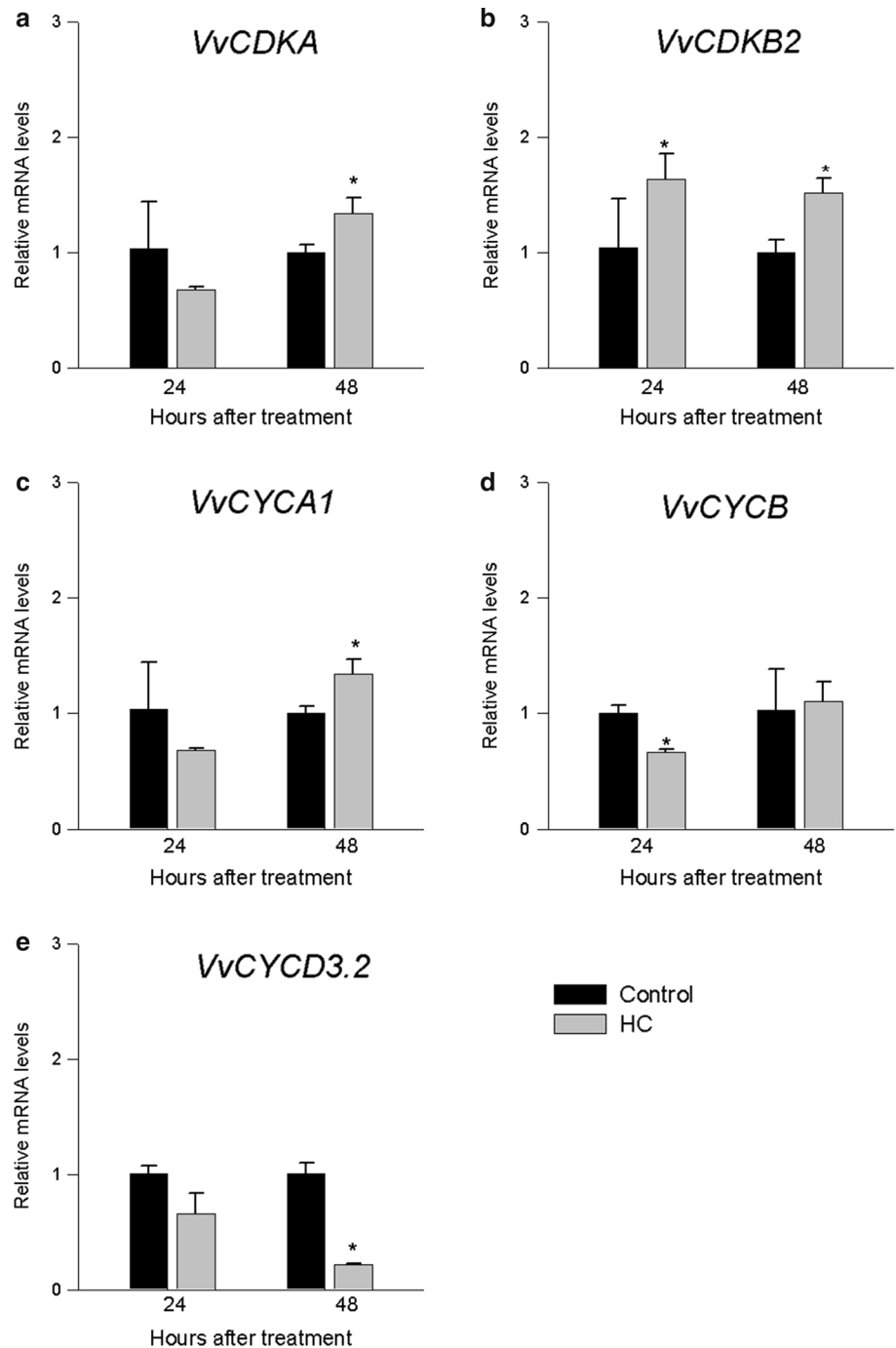


cycle. The *CDKB1* are expressed from the S-phase and peak in G2, whereas the *CDKB2* genes are expressed somewhat latter from G2-M (Menges et al. 2005). The increased expression of *VvCDKA*, *VvCDKB2* and cyclins *VvCYCA1*, *VvCYCB* and *VvCYCD3.2* in the shoot apex than in latent buds, and on the contrary, the higher expression of the inhibitor of cyclin-dependent kinase *VvICK5* in the latent bud than in the shoot apex, is consistent with a higher mitotic activity of the apex. The high mitotic activity of the shoot apex due to the high expression of *VvFT* could be the reason that explains the lack of growth cessation and the development of ED in the apex in response to SD photoperiod.

Analyzing microarray data for developmental transition in grapevine buds (Díaz-Riquelme et al. 2012), it was found that *VvFT* co-expressed with cell cycle genes. Thus, during the transition from PD to ED the level of *VvFT* decreased similarly to cell cycle regulators *VvCDKA*, *VvCDKB2*, *VvCYCA1*, *VvCYCD3.2*, while during the transition from ED to bud-break, *VvFT* level increased together with cell cycle genes. This finding suggests that *VvFT* could transcriptionally regulate cell cycle genes, and

by means of them, regulates the development of ED. The development of ED is an adaptive trait that has a profound effect on cell proliferation. Previous studies have suggested that endodormant cells are predominantly arrested in the G1 phase of the cell cycle. Changes in cell-specific gene expression occur during release of axillary buds of pea (Devitt and Stafstrom 1995) potato (Campbell et al. 1996) adventitious buds of leafy spurge (Horvarth et al. 2002) and Jerusalem artichoke (Freeman et al. 2003) from dormancy. Here, it was found that the dormancy releasing compound hydrogen cyanamide (H_2CN_2) up-regulates the expression of *VvFT* and *VvAP1* together with the expression of cell cycle genes *VvCDKA*, *VvCDKB2* and *VvCYCA1* in dormant grapevine buds, suggesting that the release of dormancy is accompanied by an increase in mitotic activity of meristematic cells, and cell cycle genes may be transcriptionally regulated by *VvFT* through the mediation of *VvAP1*. However, *VvAIL2* participation in the *VvFT* signaling cascade is questioned, since their expression is not affected by H_2CN_2 . To reach a definitive conclusion on the regulation of cell cycle genes by *VvFT*, analyzing the effect of *VvFT* overexpression on the expression of cell cycle

Fig. 5 a–e Effect of hydrogen cyanamide (H_2CN_2) on the expression of cell cycle genes in dormant buds of *V. vinifera* cv. Thompson seedless. Gene expression analysis was performed 24 and 48 h after treatment by RT-qPCR normalized against *VvUBIQUITIN*. Values are the average of three biological replicates with three technical repetitions $\pm$ SD (asterisk) Student's *t* test ($\alpha = 0.05$)



genes (CCG), either in a homologous or heterologous system is needed.

Author contribution statement RV and FJP designed research; RV, XN, FP and DD performed research; FJP analysed data; RV and FJP wrote the paper.

Acknowledgments Financial support of FONDECYT project 1140318 and doctoral fellowship to R. Vergara by CONICYT are gratefully acknowledged.

References

- Azeez A, Miskolczi P, Tylewicz S, Bhalerao RP (2014) A tree ortholog of *APETALA1* mediates photoperiod control of seasonal growth. *Curr Biol* 24:717–724
- Blazková J, Krekule J, Machácková I, Procházka S (1999) Auxin and cytokinins in the control of apical dominance in pea: a differential response due to bud position. *J Plant Physiol* 154:691–696
- Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner AM, Jansson S, Strauss SH, Nilsson O (2006) *CO/FT* Regulatory module

- controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312:1040–1043
- Campbell MA, Suttle JC, Sell TW (1996) Changes in cell cycle status and expression of p34^{cdc2} kinase during potato tuber meristem dormancy. *Physiol Plant* 98:743–752
- Chang S, Puryear J, Cairney JA (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11:113–116
- Crabbé JJ (1984) Correlative effects modifying the course of bud dormancy in woody plants. *Z Pflanzenphysiol* 113:465–469
- Devitt ML, Stafstrom JP (1995) Cell cycle regulation during growth-dormancy cycles in pea axillary buds. *Plant Mol Biol* 29:255–265
- Díaz-Riquelme J, Grimplet J, Martínez-Zapater JM, Carmona MJ (2012) Transcriptome variation along bud development in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biol* 12:181
- Fennell A, Hoover E (1991) Photoperiod influences growth, bud dormancy and cold acclimation of *Vitis labruscana* and *V. riparia*. *J Am Soc Hort Sci* 116:270–273
- Freeman D, Riov-Khamlichic Oaken EA, Murray JA (2003) Isolation, characterization and expression of cyclin and cyclin-dependent kinase genes in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *J Exp Bot* 54:303–308
- Gegas VC, Doonan JH (2006) Expression of cell cycle genes in shoot apical meristems. *Plant Mol Biol* 60:947–961
- Grant TNL, Gargrave J, Dami IE (2013) Morphological, physiological, and biochemical changes in *Vitis* genotypes in response to photoperiod regimes. *Am J Enol Vitic* 64:466–475
- He D, Mathiason K, Fennell A (2012) Auxin and cytokinin related gene expression during active shoot growth and latent bud paradormancy in *Vitis riparia* grapevine. *J Plant Physiol* 169:643–648
- Horvath DP, Chao WS, Anderson JV (2002) Molecular analysis of signals controlling dormancy and growth in underground adventitious buds of leafy spurge. *Plant Physiol* 128:1439–1446
- Horvath DP (2009) Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Sci* 177:523–531
- Joubés J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D, Umeda M, Renaudin JP (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* 43:607–620
- Karlberg A, Bako L, Bhalerao RP (2011) Short day mediated cessation of growth requires the downregulation of AINTEGUMENTA-LIKE1 transcription factor in hybrid aspen. *PLoS Genet* 7:e1002361
- Kühn N, Ormeño-Núñez J, Jaque-Zamora G, Pérez FJ (2009) Photoperiod modifies the diurnal expression profile of *VvPHYA* and *VvPHYB* transcripts in field-grown grapevines. *J Plant Physiol* 166:1172–1180
- Lang GA (1987) Dormancy: a new universal terminology. *Hort Sci* 22:817–820
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 25:402–408
- Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41:546–566
- Mizukami Y, Fischer RL (2000) Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:942–947
- Noriega X, Burgos B, Pérez FJ (2007) Short-day photoperiod triggers and low temperature increase expression of peroxidase RNA transcripts and basic peroxidase isoenzyme activity in grapevine-buds. *Phytochemistry* 68:1376–1383
- Or E (2009) Grape bud dormancy release, the molecular aspect. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Grapevine molecular physiology and biotechnology*. Springer, Berlin, pp 1–29
- Petterle A, Karlberg A, Bhalerao RP (2013) Daylength mediated control of seasonal growth pattern in perennial trees. *Curr Opin Plant Biol* 16:301–306
- Resman L, Howe G, Jonsen D, Englund M, Druart N, Schrader J, Antti H, Skinner J, Sjödin A, Chen T, Bhalerao RP (2010) Components acting downstream of short day perception regulates differential cessation of cambial activity and associated responses in early and late clones of hybrid poplar. *Plant Physiol* 154:1294–1303
- Rohde A, Bhalerao RP (2007) Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Sci* 12:217–223
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–386
- Sreekantan L, Mathiason K, Grimplet J, Schlauch K, Dickerson JA, Fennell AY (2010) Differential floral development and gene expression in grapevines during long and short photoperiods suggests a role for floral genes in dormancy transition. *Plant Mol Biol* 73:191–205
- Suzuki T (1990) Apical dominance in mulberry (*Morus alba*): effects of position of lateral and accessory buds and leaves. *Physiol Plant* 78:468–474
- Tylewicz S, Tsuji H, Miskolczi P, Petterle A, Azees A, Jonson K, Shimamoto K, Bhalerao RP (2015) Dual role of florigen activation complex component FD in photoperiodic growth control and adaptive response pathways. *PNAS* 112:3140–3145
- Vergara R, Rubio S, Pérez FJ (2012) Hypoxia and hydrogen cyanamide induce bud-break and up-regulate hypoxic responsive genes (HRG) and *VvFT* in grapevine buds. *Plant Mol Biol* 79:171–178
- Wake CMF, Fennell A (2000) Morphological, physiological and dormancy responses of three *Vitis* genotypes to short photoperiod. *Physiol Plant* 109:203–210