

PROPRIEDADES HIDRÁULICAS EM BAGAS EM
DESENVOLVIMENTO DE *Vitis labrusca* L. cv. NIAGARA ROSADA:
RELAÇÃO ENTRE VITALIDADE DO MESOCARPO E
FUNCIONALIDADE DO XILEMA

JOVIANA LERIN

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2016

PROPRIEDADES HIDRÁULICAS EM BAGAS EM
DESENVOLVIMENTO DE *Vitis labrusca* L. cv. NIAGARA ROSADA:
RELAÇÃO ENTRE VITALIDADE DO MESOCARPO E
FUNCIONALIDADE DO XILEMA

JOVIANA LERIN

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

Orientador: Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCT / UENF**

60/2016

Lerin, Joviana

Propriedades hidráulicas em bagas em desenvolvimento de *Vitis labrusca* L. Cv. Niagara Rosada : relação entre vitalidade do mesocarpo e funcionalidade do xilema / Joviana Lerin. – Campos dos Goytacazes, 2016.

70 f.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Ricardo Enrique Bressan.

Área de concentração: Fisiologia vegetal.

Bibliografia: f. 52-59.

1. UVA 2. AMADURECIMENTO 3. MORTE CELULAR 4. FLUXO VASCULAR I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal II. Título

CDD 634.8

PROPRIEDADES HIDRÁULICAS EM BAGAS EM
DESENVOLVIMENTO DE *Vitis labrusca* L. cv. NIAGARA ROSADA:
RELAÇÃO ENTRE VITALIDADE DO MESOCARPO E
FUNCIONALIDADE DO XILEMA

JOVIANA LERIN

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

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2016.

Comissão Examinadora:

Juliana Costa Guimarães (D. Sc. Produção Vegetal) - UENF

Leandro Hespanhol Viana (D.Sc. Produção Vegetal) - UENF

Gleudson Moraes de Souza (D.Sc. Produção Vegetal) - PMP

Prof^o. Ricardo Enrique Bressan-Smith (D.Sc. Produção Vegetal) - UENF
(Orientador)

DEDICO

Ao meu pai, Darci Lerin, minha maior referência e aos meus amados irmãos, Eliete, Jociane e Eder, de nada adiantaria meu esforço se eu não tivesse cada um de vocês ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A pesquisa e bolsas de estudos tiveram apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Eu gostaria de agradecer à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pelo ensino de qualidade.

Ainda, agradeço à equipe de laboratório do Setor de Fisiologia Vegetal da UENF, aos professores e, de maneira especial, ao meu orientador Ricardo Bressan-Smith, pelo conhecimento transmitido e pela credibilidade.

A todos os colegas e amigos, que de alguma maneira estiveram envolvidos na realização deste trabalho, eu agradeço pelo apoio, confiança, companheirismo, paciência e disponibilidade.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE	4
3. OBJETIVO.....	5
3.1. Objetivo Geral	5
3.2. Objetivos Específicos.....	5
4. REVISÃO DE LITERATURA	6
4.1. Aspectos gerais da morfologia e fisiologia da videira	6
4.2. Crescimento e desenvolvimento da baga	10
4.4. Relações hídricas e desenvolvimento da baga.....	14
5. MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1. Material vegetativo	23
5.2. Estratégia experimental	24
5.3. Funcionalidade do xilema	25
5.3.1. Infusão passiva	25
5.3.2. Sistema de capilaridade.....	26
5.4. Avaliação do efluxo (backflow).....	27
5.5. Vitalidade celular do mesocarpo	29
5.5.1. Determinação de área como vitalidade celular	29
5.6. Análises qualitativas do desenvolvimento das bagas	29
5.6.1. Peso e sólidos solúveis totais	30
5.6.2. Coloração da casca	30

5.6.3. Deformabilidade das bagas	30
5.6.4. Diâmetro das bagas em desenvolvimento	30
5.7. Análise estatística	30
6. RESULTADOS	32
6.1. Dinâmica do amadurecimento da baga.....	32
6.2. Funcionalidade do xilema (influxo).....	35
6.3. Efluxo de água através do xilema da baga	37
6.4. Vitalidade das células do mesocarpo.....	39
7. DISCUSSÃO	43
8. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

RESUMO

LERIN, Joviana, MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2016. Propriedades Hidráulicas em Bagas em Desenvolvimento de *Vitis labrusca* L. cv. Niagara Rosada: Relação Entre Vitalidade do Mesocarpo e Funcionalidade do Xilema. Orientador: Ricardo Enrique Bressan-Smith.

O xilema é o principal fornecedor de água para bagas desde o aparecimento do fruto até o início do amadurecimento. Deste ponto em diante, ocorre diminuição no influxo de água, como resultado da redução do gradiente hidrostático entre o xilema do pedicelo e o xilema da baga. Neste trabalho, a variedade Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) foi utilizada como modelo de estudo com a expectativa de entender as variações do fluxo da seiva do xilema durante o desenvolvimento das bagas, e que uma provável diminuição estaria associada à perda de permeabilidade das membranas celulares e, conseqüentemente, da vitalidade das células do mesocarpo. As bagas foram avaliadas semanalmente a partir dos dez dias após a antese (DAA) até 95 DAA (bagas pós-maduras) e foram avaliadas em termos de funcionalidade do xilema por meio de dois métodos de coloração, com base na absorção de fucsina ácida: a infusão passiva e o sistema de capilaridade. A ocorrência de efluxo foi avaliada em bagas ligadas à planta-mãe, utilizando um sistema de coloração do xilema por infusão reversa. Além disso, a vitalidade das células do mesocarpo foi observada pelo uso de um corante fluorescente (FDA). Os resultados das análises de vitalidade celular do mesocarpo e funcionalidade do xilema comprovaram que, tanto influxo quanto efluxo de água, via xilema,

cessaram no início do amadurecimento, no mesmo período em que a taxa de perda de vitalidade celular no mesocarpo foi intensificada. As mudanças fisiológicas avaliadas aconteceram no início do amadurecimento para a variedade Niagara Rosada, levando as bagas ao isolamento hidráulico dos vasos xilemático. A paralisação do fluxo de água via xilema, durante o amadurecimento, favoreceu a manutenção de características físicas das bagas, como a conservação do tamanho, mesmo quando essas atingiram elevada taxa de perda de vitalidade celular.

Palavras-chave: uva, amadurecimento, morte celular, fluxo vascular.

ABSTRACT

LERIN, Joviana, MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February 2016. Hydraulic Properties in Developing Berries of *Vitis labrusca* L. cv. Niagara Rosada: Relationship Between Mesocarp Vitality and Xylem Functionality. Adviser: Ricardo Enrique Bressan-Smith.

Xylem is the main water supplier for berries from the appearance of the fruit until the beginning of ripening. Thereafter, it occurs a decrease in the water inflow as a result of the reduction in the hydrostatic gradient between the pedicel xylem and the berry xylem. In this study, the Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) variety was used as a model with the expectation to understand the changes in the xylem sap flow during the development of berries and whether a probable decrease is associated with loss of permeability of cell membranes, and consequently the loss of vitality in the mesocarp cells. The berries were collected weekly from 10 DAA (days after anthesis) to 95 DAA (post-ripened stage) and evaluated for xylem functionality using two staining methods based on the acid fuchsin absorption: passive infusion and simple wicking system. Backflow was evaluated in berries attached to the vine using axylem staining system by reverse infusion). Furthermore, the vitality of mesocarp cells was observed by using a fluorescent dye (FDA). The analyzes of mesocarp cell vitality and xylem functionality showed that both water inflow and backflow via xylem ceased at the beginning of ripening, at the same period in which the loss rate of cellular vitality in the mesocarp was intensified. The physiological changes evaluated occurred at the beginning of ripening for the Niagara Rosada variety, leading the berries to the hydraulic

isolation of xylem vessels. The standstill of the water flow via xylem during ripening has favored the maintenance of physical characteristics of the berry, such as size conservation, even when the berries reached elevated loss rates of cellular vitality.

Keywords: grape, ripening, cell death, vascular flow.

1. INTRODUÇÃO

O fluxo de água através dos tecidos vasculares tem importante contribuição para o crescimento e desenvolvimento das bagas de uva (Bondada et al., 2005), devido ao aumento no turgor e expansão celular (Thomas et al., 2006; Matthews et al., 2009). Estudos indicam que a dinâmica do fornecimento de água varia com o período de desenvolvimento da baba, sendo o xilema o principal fornecedor desde o aparecimento do fruto até o amadurecimento, período denominado *veraison*, em que se iniciam alterações no acúmulo de açúcares, variações em níveis hormonais, aumento na deformabilidade da baba, mudança na coloração da casca e em componentes do sabor da baba (Coombe e McCarthy, 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2003; Castellarin et al., 2011). Em bagas pós-*veraison*, o crescimento e o amadurecimento parecem ficar dependentes do influxo de água via floema (Tyerman et al., 2004).

A mudança no fornecimento de água após o *veraison*, de xilema para floema, tem sido detectada por técnicas de absorção de corantes e absorção de cálcio pelos vasos xilemáticos da baba, sugerindo que havia perda de funcionalidade do xilema devido à formação de barreiras físicas nos vasos, como impregnação por tilose ou dano estrutural. Essa foi a primeira evidência para explicar o isolamento hidráulico, que pode acontecer em escala celular, em que células do mesocarpo podem ser isoladas do apoplasto circundante ou do tecido xilemático, e em escala do órgão, em que os vasos do xilema do fruto se tornam isolados do xilema da planta mãe (Düring et al., 1987; Findlay et al., 1987; Lang e Düring, 1991; Creasy et al., 1993; Coombe e McCarthy, 2000, Rogiers et al., 2000; Tyerman et al., 2004).

Entretanto, a interrupção física foi contestada a partir de avaliações da condutância hidráulica do xilema, com o auxílio de sonda de pressão, mostrando um progressivo aumento da resistência à entrada de água na baga ao longo do desenvolvimento e não simplesmente a interrupção física do xilema (Tyerman et al., 2004; Choat et al., 2009). Qualitativamente, Bondada et al., (2005) também confirmou a existência de condutância hidráulica em bagas pós-*veraison*, a partir da movimentação de corante, quando foi fornecida uma força de condução suficiente para manter o fluxo, via xilema, para dentro da baga. Isso confirmou a hipótese de redução do gradiente hidrostático entre o xilema do pedicelo e o do mesocarpo da baga (Bondada et al., 2005), mesmo com existência de um potencial osmótico fortemente negativo no apoplasto do mesocarpo de bagas pós-*veraison* (Tyerman et al., 2004).

Adicionalmente, Lang e Düring (1991) sugeriram a perda de compartimentação das células do mesocarpo como uma parte normal do desenvolvimento da baga. Isso explicaria a perda generalizada do conteúdo celular para o apoplasto, levando à perda da viabilidade celular, da firmeza e da pressão de parede da célula. A tensão nos vasos xilemáticos do pedicelo só pode ser equilibrada pelo potencial osmótico negativo das células do mesocarpo se estas permanecerem com permeabilidade seletiva (Tilbrook e Tyerman, 2008). Com isso, a tensão formada seria suficiente para gerar o influxo de água da planta-mãe para a baga, via xilema (Tyerman et al., 2004; Bondada et al., 2005). Dentro desse contexto, é interessante verificar a funcionalidade do xilema e sua relação com a vitalidade das células do mesocarpo, mais precisamente sobre a atividade das membranas celulares do mesocarpo das bagas.

A perda de vitalidade das células do mesocarpo tem sido relatada, no final do amadurecimento, quando as bagas alcançam o peso máximo (Lang e Düring, 1991; Dreier et al., 1998; Sadras e McCarthy, 2007). Em bagas pós-*veraison* de Syrah e Chardonnay, a morte celular atingiu cerca de 30% e 50% da área do mesocarpo, respectivamente (Fuentes et al., 2010). Em bagas de Syrah, houve ainda mudança no fluxo de água, via xilema, para fora de bagas, fenômeno denominado *backflow* ou efluxo. Tilbrook e Tyerman (2009) demonstraram que, para essa variedade, o efluxo pode ocorrer até 118 dias após a antese e é intensificado justamente quando se inicia a perda de vitalidade das células do

mesocarpo, portanto, estes fatores ocorrendo ao mesmo tempo seriam responsáveis pela rápida perda de peso e murcha das bagas a partir do *veraison*.

Diante do exposto, torna-se essencial a compreensão sobre o declínio do fluxo de água, via xilema, ao longo do desenvolvimento das bagas e as diferenças varietais que podem ter influência em tais alterações. A variedade Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) parece apresentar uma predisposição à ocorrência de perda de vitalidade das células do mesocarpo a partir do *veraison*, percebida fisicamente pela mudança da consistência da polpa que se torna mais tenra e pouco crocante. A ocorrência de perda da permeabilidade das membranas celulares pode ter como consequência mudanças nas propriedades fisiológicas das bagas, por exemplo, no fluxo de água da planta-mãe para a baga e vice-versa.

Este trabalho tem como objetivo compreender se a mudança na tensão do xilema entre baga e planta-mãe, que ocasiona alteração no influxo e efluxo de água via xilema, está associada à perda da permeabilidade das membranas e, conseqüentemente, da vitalidade das células do mesocarpo, durante a fase de amadurecimento da baga.

2. HIPÓTESE

A alteração no gradiente de pressão do xilema, que tem influência na mudança de influxo e efluxo de água durante o amadurecimento das bagas, está associada à perda da permeabilidade das membranas e, conseqüentemente, da vitalidade das células do mesocarpo durante a fase de amadurecimento da boga.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo compreender se a mudança na tensão do xilema entre baga e planta-mãe, que ocasiona alteração no influxo e efluxo de água via xilema, está associada à perda da permeabilidade das membranas e, conseqüentemente, da vitalidade das células do mesocarpo, durante a fase de amadurecimento da baga.

3.2. Objetivos Específicos

- Comprovar a diminuição do fluxo de água via xilema, durante o amadurecimento das bagas.
- Mostrar que há aumento da perda de permeabilidade das membranas celulares e, conseqüentemente, perda de vitalidade das células do mesocarpo durante o amadurecimento das bagas.
- Compreender se tais alterações em nível celular podem explicar a mudança no influxo e efluxo de água na baga durante o amadurecimento.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Aspectos gerais da morfologia e fisiologia da videira

O provável centro de origem da videira é a atual Groenlândia, a difusão da videira em centros de refúgio, durante a era glacial, resultou em adaptações que determinaram o surgimento de variações entre as milhares de espécies existentes (Camargo, 1998). O gênero *Vitis*, pertencente à família das Vitaceae, é composto por mais de 70 espécies, entre elas estão *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*, *Vitis riparia* e *Vitis rupestris*. Dentro de tantas espécies destacam-se aquelas para o consumo “*in natura*” e elaboração de vinhos, sucos, entre outros, como *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*. A primeira é originada na Eurásia, na região compreendida entre os Mares Negro e Cáspio, ao Sul do Cáucaso, e a segunda na América do Norte (Hardie, 2000; Miolo e Miele, 2003; Iland et al., 2011).

A videira é considerada uma planta de clima temperado, embora apresente adaptabilidade a variadas condições climáticas. As fruteiras de clima temperado caracterizam-se pela queda das folhas no final do ciclo reprodutivo e entrada em dormência, como consequência de temperaturas mais frias decorrentes do inverno. Nas regiões de clima tropical, onde o inverno não é rigoroso ou tem curta duração, a videira não entra em dormência, favorecendo a produção de fotoassimilados e o seu crescimento (Galet, 1983; Hidalgo, 2002; Leão e Da Silva, 2003).

A dormência é o período de repouso natural de um vegetal, influenciado pelas condições ambientais, em que o metabolismo e o crescimento das plantas

são diminuídos ou paralisados até o retorno de condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento. Após o repouso hibernar inicia-se uma sucessão de fases que caracterizam o seu desenvolvimento vegetativo, sendo que o desenvolvimento de novas brotações é influenciado pelo clima do ano anterior, tendo interferência nas frutificações seguintes (Lang et al., 1987; Giovannini, 1999; Petri et al., 2006; Iland et al., 2011).

A videira é uma planta trepadeira, lenhosa de porte arbustivo (Mullins et al., 1992) perene e de folhas decíduas (Pommer, 2003). As folhas fotossinteticamente ativas e mais próximas do cacho são as que fornecem a maior parte dos açúcares necessários para o desenvolvimento da baga, assim como, para o crescimento e metabolismo da videira de maneira geral (Candolfi-Vasconcellos et al., 1994; Jackson, 2008; Iland et al., 2011).

Em regiões de clima temperado, com a chegada do inverno e a consequente queda das folhas, as gemas ficam em estado de dormência, assim, os ramos maduros armazenam uma grande quantidade de carboidratos, que servirá como fonte de energia para o crescimento das próximas brotações, quando houver condições climáticas propícias para o seu desenvolvimento (Iland et al., 2011).

A videira é caracterizada por possuir um complexo de gemas axilares, formada por gema lateral ou “gema pronta” e gema latente ou composta (Mullins et al., 1992; Pommer, 2003). A gema lateral desenvolve-se no mesmo ciclo de sua formação, não entram em dormência e raramente apresentam inflorescências. A gema composta ou latente é constituída por uma gema primária central e duas gemas secundárias menores, sendo que cada componente pode apresentar primórdios foliares e primórdios de inflorescência ou de gavinha (Morrison, 1991).

A inflorescência é chamada de panícula e sua estrutura tem forma piramidal (Pratt, 1971; Martin et al., 2009). No geral, as variedades de videira cultivadas possuem flores hermafroditas, ou seja, possuem estame e pistilo na mesma flor, podendo ocorrer autofecundação (Oberle, 1938), porém a fertilização cruzada também pode ocorrer quando o pólen de uma videira é transferido para a parte fêmea de outra e a fertilização acontece (Hardie, 2000; Iland et al., 2011).

O cacho é composto por pedúnculo, ráquis, pedicelo e flores que quando fertilizadas se tornarão bagas (Figura 1). A sua estrutura, comprimento, largura e

peso podem variar, dependendo da variedade e das práticas de manejo (Iland et al., 2011).

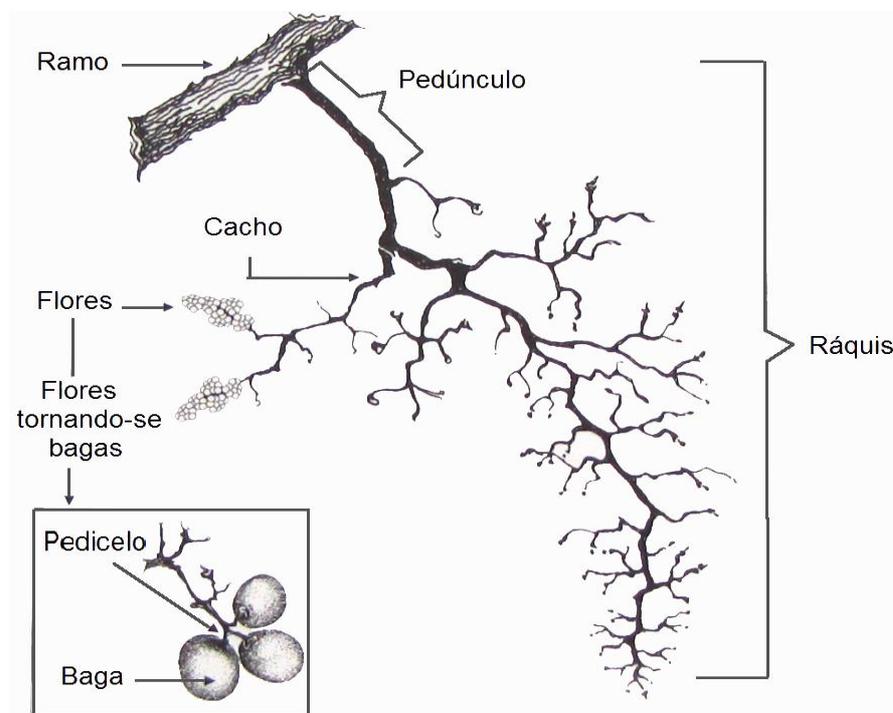


Figura 1. Estrutura do cacho. Fonte: Adaptado de Iland et al. (2011).

A uva é um fruto do tipo baga simples carnosa, reunida em cachos, constituída basicamente por casca, polpa e sementes (Figura 2). Seus tecidos são subdivididos em porção externa, que consiste em tecidos entre a hipoderme e os vasos periféricos e a parte interna formada de vasos periféricos e axiais. A porção basal de vasos periféricos e axiais próxima ao pedicelo é conhecida como *brush* ou pincel, por onde são fornecidos águas e solutos para a baga (Ribéreau-Gayonet et al., 2003; Jackson, 2008).

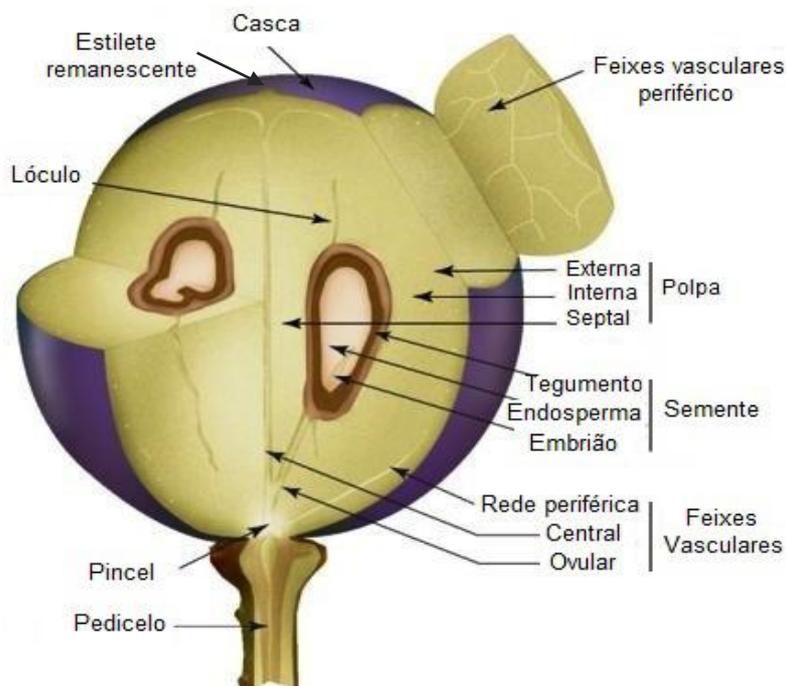


Figura 2. Esquema anatômico da baga de uva. Fonte: Adaptado de Kennedy (2002).

Na porção celular, o vacúolo de células da polpa e da casca é o responsável por armazenar grande parte da água e componentes químicos (açúcares, compostos fenólicos, ácidos e substâncias aromáticas). A água e os compostos solúveis são fornecidos à baga pelos feixes vasculares xilema e floema (Matile, 1978; Coombe e Bishop, 1980; Iland et al., 2011).

De acordo com os padrões botânicos, a estrutura da baga (pericarpo) está dividida em exocarpo (exterior), mesocarpo (parte média) e endocarpo (interior da baga) (Jackson, 2008). O mesocarpo da uva é composto basicamente de açúcares, que representa, aproximadamente, 80% do seu peso seco, cátions, aminoácidos e compostos fenólicos (Coombe, 1976; Ribéreau-Gayon et al., 2003; Castellarin et al., 2011).

A casca é formada por três camadas distintas: a cutícula - camada mais exterior, recoberta por uma capa de cera denominada pruína; a epiderme - camada intermediária que pode conter uma ou duas camadas de células e; a hipoderme - camada interna, formada por duas camadas de células diferenciadas, sendo uma superficial e outra mais profunda. Com a função de proteção, a casca apresenta grande importância para a baga por atuar como uma barreira hidrofóbica contra danos mecânicos, desidratações, infecções fúngicas e radiação

UV. Além disso, nela estão contidos, aproximadamente, 30% dos compostos fenólicos totais, entre eles ácidos benzoico e cinâmico, flavonoides e taninos. (Martin, 1964; Lecas e Brillouet, 1994; Ribéreau-Gayon et al., 2003).

A evolução do desenvolvimento do pericarpo das bagas, ao longo do tempo, foi uma adaptação necessária para aumentar a capacidade de dispersão das sementes (Iland et al., 2011). As sementes constituem, no máximo, 6% do total do peso fresco da uva, nela encontra-se o embrião e é onde está contida a maior parte dos compostos fenólicos da baga, aproximadamente 60% do total (Chira et al., 2009).

Segundo Hardie (2000), o desenvolvimento da baga pode ser descrito em dois ciclos, baseados no desenvolvimento das sementes: o primeiro de proteção e o segundo de preparação para a dispersão das sementes. O primeiro ciclo ocorre durante a frutificação até o início do amadurecimento, quando a baga acumula vários componentes, como ácido málico, ácido tartárico e taninos, que protegem a baga e previnem a dispersão das sementes antes de estarem viáveis. No segundo ciclo (fase de amadurecimento da baga), ocorrem alterações como, a diminuição dos níveis de ácido málico, ácido tartárico e taninos, mudança da coloração da casca e acúmulo de açúcares, entre outras mudanças, que tornam a baga atrativa para pássaros e outros agentes que auxiliam na dispersão das sementes, quando estas se tornam maduras e viáveis, podendo germinar e formar uma plântula, quando em contato com o solo.

4.2. Crescimento e desenvolvimento da baga

A uva é considerada um fruto não-climatérico, ou seja, sua maturação não depende do hormônio etileno, por isso, ela necessita estar ligada à planta-mãe até a sua completa maturação, para atingir as características desejáveis para consumo (Coombe e Hale, 1973; Chaves e Melo-Faria, 2006; Bapat et al., 2010).

O desenvolvimento das bagas é caracterizado por um crescimento em volume acompanhado pela evolução das suas características físicas e químicas (Reynolds et al., 1986). Seu padrão de crescimento evolui de acordo com uma curva sigmoideal dupla (Coombe, 1976), definidas por duas fases: primeira de formação e a segunda de amadurecimento (Figura 3), e essas duas fases estão divididas em quatro etapas de crescimento: 1º: crescimento pré-veraison, 2º: crescimento lento ou sem crescimento, 3º: crescimento pós-veraison e 4º:

encolhimento após o amadurecimento (Coombe, 1995; Coombe e Iland, 2004; Iland et al., 2011).

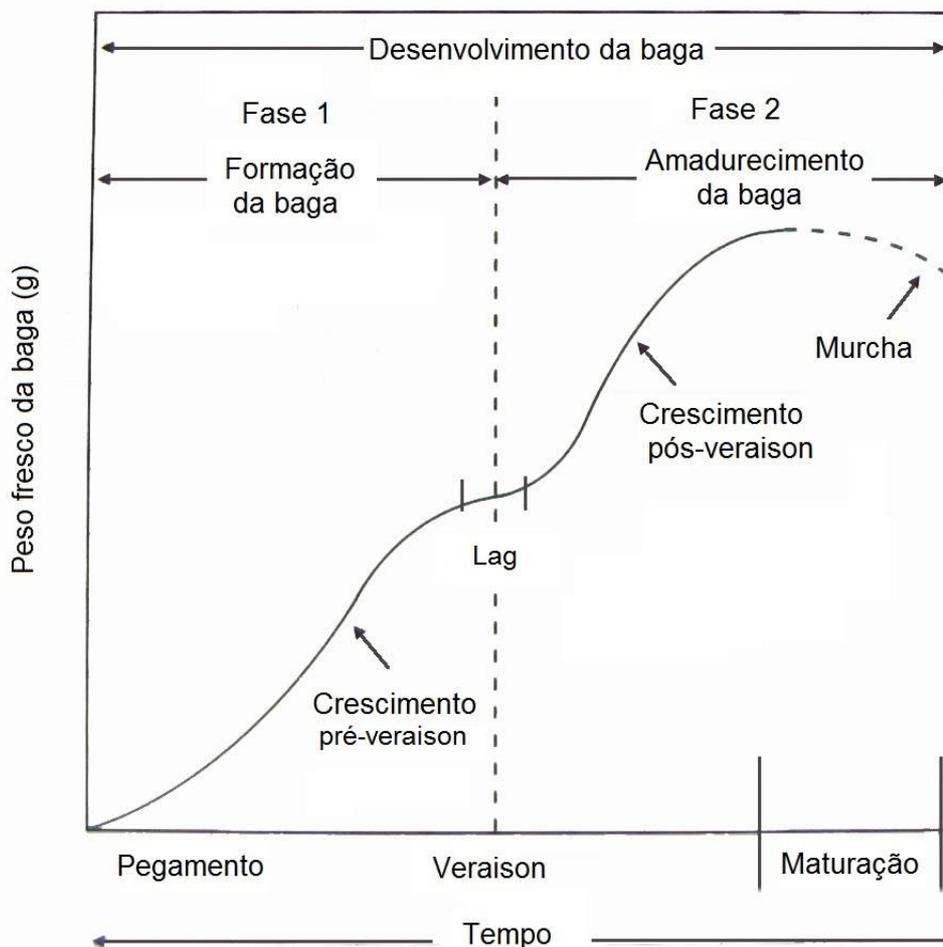


Figura 3. Curva de crescimento sigmoidal dupla em bagas de uva. Fonte: Adaptado de Iland et al. (2011).

A primeira fase de crescimento (formação da baga) é marcada pelo início do desenvolvimento da baga (após o estágio de pegamento dos frutos) e tem como principal característica o predomínio da divisão e multiplicação celular. Durante essa fase, a taxa de divisão celular é positivamente relacionada com a taxa de desenvolvimento das sementes e o número de sementes está correlacionado com a concentração dos hormônios de crescimento, citocinina e giberelina.

Além disso, nessa fase, as bagas são verdes e duras, com uma intensa atividade metabólica percebida pela elevada taxa respiratória, há também, acúmulo de ácidos, fenólicos e cátions, sendo que, alguns podem atingir o seu

máximo acumulado até o início do amadurecimento. Nessa fase, com duração de cinco a sete semanas, a água e nutrientes são fornecidos tanto via xilema quanto via floema e também pode ocorrer transpiração através de estômatos existentes na casca da baga (Findlay et al., 1987; Lang e Thorpe, 1989; Greenspan et al., 1994; Dreier et al., 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2003; Rogiers et al., 2004; Iland et al., 2011).

Entre a primeira e a segunda fase, ocorre uma rápida etapa, com duração de oito até no máximo 15 dias, onde crescimento da baga é lento ou inexistente, sendo que esse período representa a conclusão da primeira fase, quando ocorre a lignificação do endocarpo (endurecimento do caroço) e crescimento do endosperma. O final da fase de formação da baga coincide com o início do amadurecimento, que é marcada, principalmente, pela alteração da cor da casca. Na segunda fase (fase de amadurecimento), a expansão celular recomeça no mesocarpo e a baga continua a aumentar de tamanho até alcançar seu peso máximo. Essa fase é marcada, também, por grande atividade bioquímica que alteram aroma, sabor e textura da baga (Greenspan et al., 1994; Coombe e McCarthy, 2000; Matthews et al., 2009; Iland et al., 2011).

O início do amadurecimento das bagas ocorre entre o final da primeira e início da segunda fase de crescimento, denominado *Veraison*, que significa o início de mudanças fisiológicas fundamentais e culmina com o amadurecimento da baga. Essa expressão é usada para definir o grande número de alterações que ocorre a partir da segunda fase de desenvolvimento, como mudança na cor da casca, causada pela diminuição da clorofila e acúmulo de antocianinas, amolecimento da baga, acúmulo de açúcares, declínio da acidez, mudança em nível hormonal, aumento no volume da baga, entre outros (Coombe, 1992; McCarthy e Coombe, 1999; Coombe e McCarthy, 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2003; Jackson, 2008; Castellarin et al., 2011; Iland et al., 2011).

Tais mudanças contribuem para o completo amadurecimento da uva, podendo estar inter-relacionadas, porém, sem que aconteçam ao mesmo tempo. O amolecimento das bagas, por exemplo, ocorre no início da segunda fase de crescimento, várias semanas antes do amadurecimento e possivelmente precede a retomada da expansão celular (Coombe, 1976).

Também é notado um decréscimo do turgor antes de ocorrer o acúmulo de açúcares e antocianinas (Thomas et al., 2008; Matthews et al., 2009). A volta

da expansão celular, no início da segunda fase de desenvolvimento do fruto é seguida pelo acúmulo de solutos e água e esta contribui para o aumento de peso das bagas, ao mesmo tempo, grande quantidade de outros componentes solúveis se acumulam na baga (Coombe, 1976; Ribéreau-Gayon et al., 2003).

Os açúcares, importados via floema, por rota simplástica até o *veraison* e apoplástica durante o amadurecimento (Zhang et al., 2006), são rapidamente metabolizados durante o desenvolvimento da baga, porém, com o início do amadurecimento algumas modificações metabólicas ocorrem permitindo que esses açúcares acumulem.

Entre essas modificações, a diminuição da atividade respiratória é um dos responsáveis pelo maior acúmulo de açúcares na baga nesse período, uma vez que, antes do *veraison* existe uma grande intensidade respiratória, na qual a polpa e as sementes são os principais sítios respiratórios ativos, já após o *veraison*, a atividade respiratória é menos intensa e fica restrita à casca da baga (Coombe, 1976; Ribéreau-Gayon et al., 2003; Zhang et al., 2006; Iland et al., 2011).

A diminuição do teor dos hormônios de crescimento, como a auxina e o aumento de ácido abscísico e etileno, assim como, o aumento de reguladores de crescimento, como os brassinosteroides, parece estimular o processo de amadurecimento das bagas e, ao mesmo tempo, implicam na inibição da atividade de algumas enzimas como é o caso da sacarose fosfato sintase e da sacarose sintetase, que estão ligadas ao acúmulo de açúcares no vacúolo das células da baga (Symons et al., 2006; Antolin et al., 2008; Böttcher et al., 2010; Iland et al., 2011).

Os açúcares são transportados a partir das folhas, na forma de sacarose, que depois é hidrolisada na baga, assim, os principais açúcares acumulados na polpa são a glicose e a frutose, sendo a frutose o açúcar encontrado em maior quantidade na baga (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

Enquanto componentes como os açúcares, além de alcoóis, flavonoides, fenóis, proteínas e vitaminas são acumulados durante o amadurecimento, alguns ácidos param de ser produzidos, como é o caso do tartárico que é um produto secundário do metabolismo dos açúcares, outros são degradados para a produção de energia, como ocorre com o ácido málico que é armazenado no vacúolo celular a partir da degradação de açúcares, para ser utilizado durante o

amadurecimento, quando ocorre a inibição da via glicolítica. Esses dois ácidos representam 90% da quantidade total de ácidos na baga, onde são predominantemente produzidos, tendo grande participação na acidez do mosto, que é um importante componente na elaboração de vinhos (Ribéreau-Gayon et al., 2003; Castellarin et al., 2011; Iland et al., 2011).

O acontecimento de tais mudanças no metabolismo da baga é estudado há muito tempo e parece ser um processo coordenado para levar ao seu completo amadurecimento, porém, outros fatores vêm ganhando importância neste contexto a fim de caracterizar o amadurecimento em diferentes espécies e variedades. Entre esses fatores de grande relevância que ocorrem durante o amadurecimento, destacam-se a perda da vitalidade celular (Lang e Thorpe, 1989; Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008; Fuentes et al., 2010) e mudanças nas relações hídricas (fluxo via xilema e floema) entre planta mãe e fruto, e entre células e tecidos (Greenspan et al., 1996; Rogiers et al., 2001; Bruce, 2003; Tyerman et al., 2004; Bondada et al., 2005).

A perda da vitalidade das células do mesocarpo é caracterizada pela perda da capacidade seletiva da membrana, ocorrendo de forma acentuada em algumas variedades, quando estas atingem o peso máximo e pode estar intimamente ligada às mudanças no fluxo hídrico da baga (Lang e Thorpe, 1989; Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008, 2009; Fuentes et al., 2010).

As mudanças nas relações hídricas, como a diminuição do influxo via xilema e, posteriormente, do floema para o fruto e a possibilidade de existência de um fluxo reverso (da baga para a planta-mãe), podem levar à consequente perda de peso e volume no final da fase de amadurecimento, evento conhecido como encolhimento da baga (McCarthy e Coombe, 1999; Tyerman et al., 2004; Bondada et al., 2005; Tilbrook e Tyerman, 2009; Fuentes et al., 2010; Iland et al., 2011; Bonada et al., 2013). Assim, tais assuntos têm ganhado destaque na busca do entendimento das mudanças que levam ao amadurecimento da baga.

4.4. Relações hídricas e desenvolvimento da baga

As relações hídricas têm um papel determinante no crescimento e composição das bagas, sendo responsável por 80% do seu peso fresco em pós-*veraison* (Lang e Thorpe, 1989). Excesso de chuvas ou irrigação próximas à colheita pode aumentar o seu tamanho, pela absorção de água acima do

necessário, causando, assim, a diluição de solutos (açúcares, ácidos, antocianinas e etc.) ou até mesmo rachadura, quando o volume da baga excede a capacidade de elasticidade da casca, prejudicando a qualidade do fruto (Greenspan et al., 1996; Keller et al., 2006; Becker e Knoche 2012a, 2012b). No entanto, o déficit hídrico também pode comprometer o número e peso das bagas. Durante a primeira fase de crescimento (até 40 dias após o florescimento), o efeito da limitação de água na videira promove maior variação hídrica diária na planta, podendo afetar o tamanho dos frutos, que é mais sensível na primeira fase de crescimento do que na segunda fase (Perez Peña, 2004).

A taxa de crescimento da baga, de maneira geral, é menor de dia do que à noite e ao longo do desenvolvimento, a taxa de variação diurna é menor depois do *veraison* do que antes dele (Matthews et al., 2009). Essa taxa de importação de água é definida como a diferença entre a taxa de ganho ou perda de água através dos feixes vasculares e a taxa de perda de água por transpiração. No entanto, mesmo que pequena, a ocorrência de expansão e contração diurnas em bagas pós-*veraison* continuam existindo, indicando que a baga ainda permanece hidraulicamente conectada aos feixes vasculares da planta-mãe (Greer e Rogiers, 2009).

A água necessária para o desenvolvimento da uva pode ser proveniente do influxo tanto pelos vasos do xilema quanto do floema. Enquanto que a seiva via xilema é a principal fonte de água para as bagas antes do *veraison*, o floema torna-se a principal fonte de água após *veraison* (Coombe e McCarthy, 2000). Esta afirmação pode explicar porque os efeitos prejudiciais causados por estresse hídrico durante a primeira fase de crescimento são maiores do que na segunda fase, visto que, a partir do *veraison* ocorre um aumento na resistência hidráulica pelos vasos periféricos do xilema que promove a redução do abastecimento de água e nutrientes minerais para as bagas (Perez Peña, 2004).

Outras características relacionadas às propriedades hídricas das bagas também ficam evidentes, como a relação positiva entre firmeza e turgor celular durante ou próximo ao *veraison*, que pode ser observada em frutos como tomate (Mignani et al., 1995), maçã (Tong et al., 1999) e uva (Thomas et al., 2006, 2008), em que uma perda de turgor celular é evidenciada quando as bagas tornam-se amolecidas (Wada et al., 2008). A perda de água que causa o amolecimento em bagas pode ocorrer pela transpiração ou pelo xilema, em um fenômeno conhecido

como efluxo (*backflow*), no entanto, a real contribuição desses dois fatores no volume e na composição da baga ainda é difícil de estimar e, além disso, existem evidências de que a contribuição de água, seja ela via xilema ou floema, varia de acordo com a espécie, variedade e com o seu desenvolvimento (Greenspan et al., 1994).

O xilema serve como uma rota simples e de baixa resistência à água, formado de traqueídes e elementos de vaso. As células condutoras de água não possuem membranas ou organelas, formando apenas paredes celulares lignificadas e grossas, com aparência de tubos ocos através dos quais a água pode fluir com resistência relativamente baixa (Coombe e Bishop, 1980; Tyree e Sperry, 1989; Chatelet et al., 2008). Em frutos como bagas de uvas, os vasos xilemáticos formam uma rede de distribuição de água que se inicia na região conhecida como *brush*, porção basal de vasos periféricos e axiais próximas ao pedicelo (Jackson, 2008).

A seiva do xilema é uma solução aquosa de íons inorgânicos e alguns metabolitos orgânicos provenientes da raiz e é a principal fonte de água para as bagas durante a sua primeira fase de crescimento (Coombe e McCarthy, 2000). A partir daí, o influxo de água via xilema diminui gradualmente enquanto que o influxo através do floema aumenta (Greenspan et al., 1996).

As evidências da diminuição de influxo de água na baga pelo xilema levam à formação de um modelo de disfunção dos vasos xilemáticos, encontrados a partir de estudos baseados na absorção de corantes, onde um aparente bloqueio dos vasos periféricos e axiais de bagas pós-*veraison* de variedades como Muscat Gordo Blanco, Riesling, Pinot noir, e Merlot foi observado, indicando um padrão de absorção de corante em bagas em *veraison* e pós-*veraison* que fica restrito aos vasos axiais e região do *brush*, dependendo da variedade (Findlay et al., 1987; Düring et al., 1987; Creasy et al., 1993).

Segundo Zhaosen et al. (2014), em avaliação anatômica dos vasos xilemáticos de bagas da variedade Kyoho, as paredes dos vasos do xilema são visíveis e intactas em bagas pré-*veraison*, porém, após o *veraison*, as paredes dos vasos do xilema externo das bagas tornam-se rompidas e invisíveis, enquanto nos vasos centrais continuaram intactas.

No entanto, estudos com anelamento do pedicelo, avaliação de perda de água de bagas destacadas do cacho (Rogiers et al., 2001) e dados sobre

absorção de cálcio (Ca) (Rogiers et al., 2000) indicaram a existência do movimento de água pelos vasos de xilema intactos em bagas pós-*veraison*.

O Ca é um nutriente não móvel nos vasos do floema, sendo assim, ele está fortemente ligado ao fluxo de água e transpiratório já que seu transporte é exclusivamente via xilema (Saure, 2005). Já o potássio (K) é um nutriente essencial para a videira, que se move na planta tanto via xilema quanto via floema, sendo um bom comparativo para observar a possível mudança no teor de absorção do Ca, durante o desenvolvimento das bagas de uva (Mpelasoka et al., 2003). Dessa forma, é esperado que ocorram mudanças na relação entre o acúmulo de Ca e K na baga, visto que, a participação do fluxo de água via xilema e floema também mudam com o desenvolvimento da baga (Rogiers et al., 2000).

Essa tese se comprovou para a variedade Chaunac em que, o acúmulo de Ca parou no início do amadurecimento das bagas, enquanto que, o acúmulo de K continuou até o amadurecimento completo (Hrazdina et al., 1984). Em Cabernet Sauvignon o acúmulo de Ca parou, mas diminuiu no início da maturação, já o acúmulo de K foi intensificado no *veraison* (Ollat e Gaudillere, 1996).

Para a variedade Syrah, Rogiers et al. (2000) encontraram resultados um pouco diferentes, no qual, tanto Ca quanto K continuaram apresentando aumento na concentração a partir do *veraison* até o amadurecimento. Portanto, no caso da Syrah é possível afirmar que os vasos xilemáticos permanecem funcionais também em pós-*veraison* e da mesma forma, também os vasos do floema, visto que, a relação de acúmulo entre Ca e K indicou um aumento ainda maior para o K (Rogiers et al., 2000).

Para afirmar a existência de xilema funcional em bagas pós-*veraison*, Rogiers et al. (2001), por meio do uso de um tratamento que impede o funcionamento do floema, comprovaram que bagas como pedicelo anelado tiveram uma perda de peso acentuada logo após o anelamento ter sido feito, mas que foi rapidamente estabilizado. Enquanto as bagas que foram completamente removidas do cacho, mas deixadas no mesmo lugar a fim de permitir as mesmas condições de transpiração, mostraram uma perda de peso imediata e sustentada, sem recuperação posterior.

Ainda utilizando o método do anelamento, Lang e Thorpe (1989) identificaram a possibilidade da ocorrência do fluxo de água inverso via xilema,

saindo da baga para a planta-mãe, comprovando não apenas existência de influxo como de efluxo via xilema em bagas pós-*veraison*.

Outros trabalhos medindo quantitativamente a rota do xilema revelaram que o caminho permanece funcional. Com o uso de uma sonda de pressão, avaliações da condutância hidráulica foram capazes de determinar a ocorrência de um aumento na resistência à entrada de água em baga pós-*veraison*, que pode variar em magnitude dependendo da variedade. Essa resistência parece ser causada pela perda da força de condução da água (tensão) no apoplasto da baga, necessária para fazer a água se movimentar via xilema do pedicelo para a baga (Tyerman et al., 2004; Bondada et al., 2005; Choat et al., 2009).

Durante a fase de amadurecimento, mesmo com o potencial osmótico mais negativo das bagas e diminuição do influxo de água, para algumas variedades, o xilema permanece funcional e esse fator pode aumentar a possibilidade de ocorrência de efluxo (Tilbrook e Tyerman, 2009). A Figura 4 apresenta as possíveis variações hidráulicas que ocorrem na baga durante todo o seu desenvolvimento. De maneira geral, acredita-se que tanto o xilema quanto o floema sejam fornecedores de água para a baga durante a primeira fase de crescimento até o *veraison*, quando a presença de estômatos na casca, favorece a perda de água por transpiração. Com o amadurecimento da baga, o xilema e posteriormente o floema, podem diminuir e até cessar o fornecimento de água, podendo levar a baga a ter perda excessiva de água por efluxo (Tyerman et al., 2004; Iland et al., 2011).

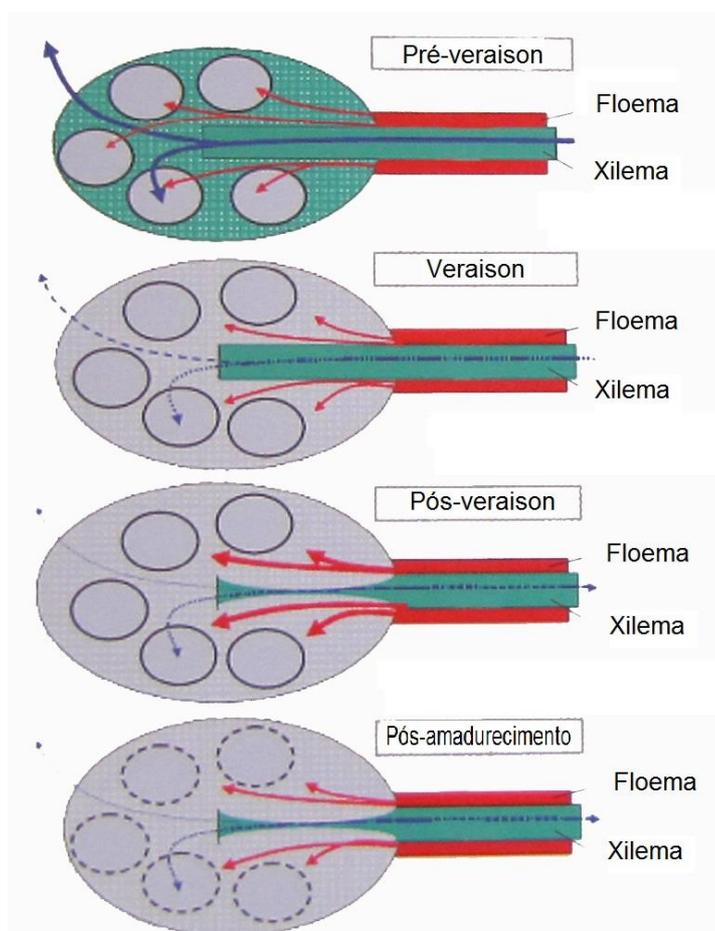


Figura 4: Mudanças no transporte de água via xilema, floema e transpiração durante o desenvolvimento de bagas. Fonte: Adaptado de Tilbrook e Tyerman (2006).

Estudos avaliando a absorção de corante pela extremidade final da baga, realizados por Tilbrook e Tyerman, (2009), revelaram uma diferença entre variedades para ocorrência de efluxo, sendo que, tanto Syrah quanto Chardonnay apresentaram traços de corante a partir da parte distal (final) da baga, pedicelo, ráquis até o pedúnculo em cachos *pré-veraison* expostos a um corante marcador xilemático. Porém, isso não ocorreu para bagas *pós-veraison* de Chardonnay aos 97 DAA, quando nenhum traço de corante foi encontrado, sugerindo isolamento do xilema da baga a partir da videira. Por outro lado, 101 DAA ainda foram encontrados traços de corante na ráquis e no pedicelo de bagas de Syrah.

Já para Thompson Seedless, o efluxo não foi aparente em nenhum momento do desenvolvimento, porque a baga é capaz de gerar pressões apoplásticas negativas que podem equilibrar as pressões negativas do xilema na videira (Tilbrook e Tyerman, 2008), uma vez que essa variedade continua hidraulicamente conectada à planta-mãe.

Desta maneira, para a variedade Syrah, por exemplo, se o xilema não está interrompido após o *veraison*, é possível que ocorra também efluxo de água durante esse período, se houver gradiente de pressão necessário em tal direção. Assim, a ocorrência de efluxo pode levar a perda excessiva de água pela baga, tendo como consequência uma perda de peso e volume acentuado próximo ao ponto de colheita das bagas (Tyerman et al., 2004; Tilbrook e Tyerman, 2009; Fuentes et al., 2010).

A porcentagem de perda de peso ou murcha da baga é diferente e depende de cada variedade. Esse encolhimento é visto como resultado da redução da entrada de água pelos vasos condutores floema e xilema e pela perda de água por efluxo, bem como, por transpiração (Rogiers et al., 2004, 2006; Tyerman et al., 2004; Keller et al., 2006; Tilbrook e Tyerman, 2009; Fuentes et al., 2010; Iland et al., 2011).

Além da diminuição da entrada de água via xilema, que ocorre a partir do *veraison*, dependendo da variedade, pouco antes do peso máximo ser alcançado, foi proposto que o fluxo de água via floema para a baga também pode diminuir ou até cessar, resultando em perda de água por transpiração superior à entrada de água (Tyerman et al., 2004; Greer e Rogiers, 2009). Além disso, o excesso de água do floema pode sofrer uma espécie de reciclagem e ser conduzida, via xilema, de volta para a planta-mãe, estes fatores resultam na redução do peso das bagas (Keller et al., 2006; Tilbrook e Tyerman, 2009).

A murcha das bagas no final do ciclo, próximo ao ponto de colheita, pode ter significantes consequências na produção total de um vinhedo, não apenas pela perda de peso, que diminui produtividade, como também, pela deterioração dos componentes de aroma que podem influenciar na qualidade e sabor de vinhos e derivados produzidos a partir dessas uvas (Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008; Iland et al., 2011).

Esses resultados levaram pesquisadores a incluir uma quarta etapa de desenvolvimento das bagas de uva (Coombe e Iland, 2004; Iland et al., 2011), por apresentar impactos sobre a concentração de açúcares e desenvolvimento do sabor (Coombe e McCarthy, 2000), concentrações de nutrientes minerais das bagas (Rogiers et al., 2000) e sobre a estimativa de rendimento final da cultura para viticultores (McCarthy, 1999). O estágio de encolhimento das bagas pode ser considerado a última etapa de desenvolvimento (Figura 3) dentro da fase de

amadurecimento de bagas em algumas variedades de uva (Iland et al., 2011). A perda de peso difere para cada variedade, em Syrah, por exemplo, tem sido correlacionada, também, com a perda de vitalidade de células do mesocarpo (Fuentes et al., 2010).

A morte celular programada é um evento comum em tecidos vegetais (Greenberg, 1996; Thomas et al., 2009). Em uvas, estudos mostram que a morte celular programada ocorre em células do mesocarpo de bagas, na etapa final de amadurecimento, podendo ter interferência nas características sensoriais das bagas e afetar as relações hídricas entre baga e planta-mãe, devido à perda da competência osmótica da membrana celular (Lang e Düring, 1991; Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008; Iland et al., 2011). A perda de integridade das células torna o mesocarpo um compartimento sem divisões, deixando a baga mais parecida como um envoltório de água e açúcares do que com um complexo sistema de tecidos vegetal (Lang e Thorpe 1989; Krasnow et al. 2008).

O uso do corante FDA (Diacetato de Fluoresceína) tem sido útil para comprovar a mudança na vitalidade celular do mesocarpo ao longo do amadurecimento das bagas. O FDA é uma molécula não-polar, permeável em membranas celulares íntegras. Após entrar na célula, o acetato da molécula de FDA é clivado por ésteres citoplasmáticos, tornando-se polar e produzindo fluoresceína que ficam presos nas células, apresentando fluorescência quando expostas a uma luz azul (Jones e Senft, 1985; Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008).

Portanto, a existência de ésteres citoplasmáticos ativos, juntamente com a presença de membrana e vacúolo funcionais permite que a célula com fluoresceína apresente fluorescência. Consequentemente, a presença de fluoresceína e fluorescência das células quando expostas à luz, implica na existência de integridade de membrana e também indica existência de vitalidade celular (Jones e Senft, 1985; Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008).

A utilização do corante FDA em células do mesocarpo de bagas da variedade Chardonnay revelou que a perda de vitalidade foi intensificada no final do período de amadurecimento das bagas, mostrando a possível existência de um equilíbrio entre a morte celular programada das células do pericarpo e a queda na condutância hidráulica da baga para videira, reduzindo, assim, a possibilidade de ocorrência de efluxo. Em Syrah, a perda da vitalidade celular foi

percebida mais cedo que para a variedade Chardonnay, porém, a condutância hidráulica entre baga e planta-mãe permaneceu alta, contribuindo para ocorrência de efluxo e para a perda de peso das bagas após atingirem o seu peso máximo, durante a fase de amadurecimento (Tyerman et al., 2004; Tilbrook e Tyerman, 2008; 2009; Fuentes et al., 2010).

Já para a variedade Thompson Seedless, a vitalidade celular foi mantida até o final do desenvolvimento e com ela também a condutância hidráulica, assim, as células mantêm um grande gradiente osmótico no pericarpo, evitando a ocorrência de efluxo (Tilbrook e Tyerman, 2008; 2009). Sendo assim, a perda da permeabilidade da membrana e vitalidade celular do mesocarpo pode ajudar a explicar a mudança nas relações hídricas entre baga e planta-mãe, em resposta da mudança do potencial osmótico, para mais negativo e a diminuição da pressão no xilema.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material vegetativo

Os experimentos foram realizados com videiras cultivadas em vasos com capacidade para 16L de solo, contendo como substrato uma mistura de Latossolo Vermelho-Escuro (LVE), distrófico, textura argilosa, esterco de curral e areia, na proporção 1:1:1. As avaliações foram realizadas em bagas da variedade Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) enxertadas sobre porta-enxerto IAC 572, plantadas em abril de 2013, conduzidas no sistema de espaldeira e irrigadas por gotejamento, na casa de vegetação do setor de fisiologia vegetal, com estrutura telada, localizada no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, RJ.

Para a realização do experimento, as videiras foram podadas no dia 25 de janeiro de 2015. A antese aconteceu em torno do dia 18 de fevereiro e as análises iniciaram no dia 01 de março, aproximadamente dez dias após a antese (DAA), e foram realizadas semanalmente até os 95 dias DAA, sendo que o *veraison* ocorreu aos 51 DAA e as bagas atingiram o amadurecimento completo aos 85 dias DAA.

Os dados de temperatura foram registrados por meio de um sensor automático *Datalogger WatchDog*® instalado na área experimental, programado para coletar dados em intervalos de 30 min, durante todo período de avaliação são apresentados na Figura 5.

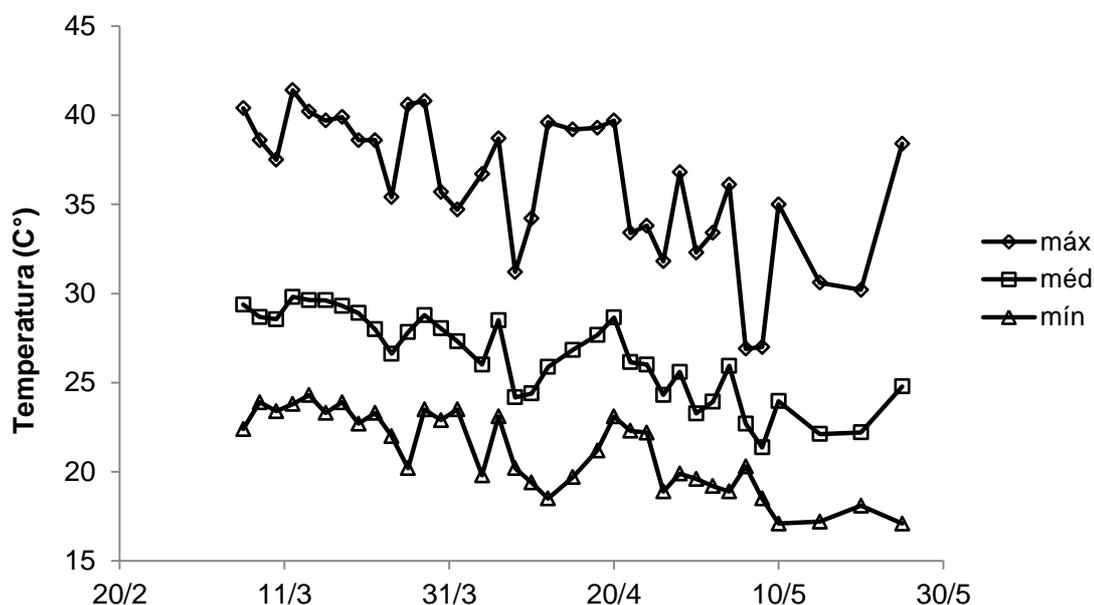


Figura 5. Temperaturas máxima, média e mínima, registradas com auxílio de um sensor automático durante o desenvolvimento da uva Niagara Rosada em casa de vegetação, a partir dos 21 DAA até 98 DAA, durante o período de março a maio de 2015.

5.2. Estratégia experimental

Neste trabalho foi avaliada a perda de vitalidade celular do mesocarpo e a sua relação com a diminuição da funcionalidade xilemática. Para isso, bagas da variedade Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) foram submetidas a análises descritivas que permitiram a caracterização qualitativa das mudanças fisiológicas que ocorrem durante o seu desenvolvimento. Para tanto, o uso de fucsina ácida, um corante marcador de xilema, foi necessário a fim de identificar, a partir da movimentação do corante pelos feixes xilemáticos, as mudanças no influxo do corante e, presumidamente, de água, assim como, a possibilidade de efluxo de corante/água de volta para a planta-mãe durante o desenvolvimento das bagas.

Paralelo a isso, a avaliação com o corante Diacetato de fluoresceína (FDA) foi realizada a fim de comprovar a perda de permeabilidade das membranas e, conseqüentemente, a perda de vitalidade das células do mesocarpo ao longo do desenvolvimento das bagas, na expectativa de que tais mudanças estivessem relacionadas com a diminuição na funcionalidade do xilema e a resistência à entrada e saída de água das bagas, uma vez que a tensão formada para gerar o influxo de água da planta-mãe para a boga só pode ser

equilibrada pelo potencial osmótico negativo das células do mesocarpo se essas permanecerem com permeabilidade seletiva, ou seja, com vitalidade celular.

Juntamente, os resultados das avaliações físicas e químicas das bagas foram utilizados para relacionar e justificar os resultados encontrados para funcionalidade do xilema e vitalidade celular, durante desenvolvimento das bagas em dias após a antese, além de, caracterizar qualitativamente esta variedade em cada período de avaliação.

5.3. Funcionalidade do xilema

Os estudos do influxo de corante foram realizados de duas formas para avaliação da funcionalidade dos vasos xilemáticos, por infusão passiva e por sistema de capilaridade. A fase de desenvolvimentos das bagas foi determinada pela contagem de dias após a antese (DAA). As avaliações foram iniciadas quando as bagas tinham em torno de 10 DAA e foram realizadas semanalmente até os 95 DAA, sendo que o *veraison* ocorreu aos 51 DAA e as bagas atingiram o amadurecimento completo aos 85 DAA.

Em cada data de avaliação os cachos eram coletados aleatoriamente antes de oito horas da manhã e colocados em sacos plásticos, sob resfriamento para evitar perdas por transpiração. As amostras foram imediatamente levadas para o Laboratório de Fisiologia Vegetal da UENF, onde 20 bagas, 10 para cada método de avaliação, descritos abaixo, foram utilizadas para coloração.

5.3.1. Infusão passiva

No laboratório, as bagas com pedicelo foram destacadas do cacho, após imersão em água para evitar embolismo, o que poderia impedir a absorção do corante. O pedicelo das bagas foi imediatamente submerso em 2 ml de uma solução aquosa de fucsina ácida a 0,1%, previamente acondicionada em tubo Eppendorf (Talbot, 1955) como demonstra a Figura 6. Após cinco horas de imersão, as bagas foram retiradas da solução para observação dos traços do corante nos vasos xilemáticos das bagas intactas. Foram realizados cortes transversal e longitudinais de cada baga com ajuda de lâmina de bisturi para avaliação visual da revelação da fucsina nos vasos periféricos e nos vasos centrais, próximos às sementes. Os cortes foram observados por estereoscópio

modelo Luxeo 4DLabomed, com sistema de zoom de 4:4:1, com câmera digital acoplada de 5 MP e as imagens capturadas pelo auxílio do software PixePro TM.

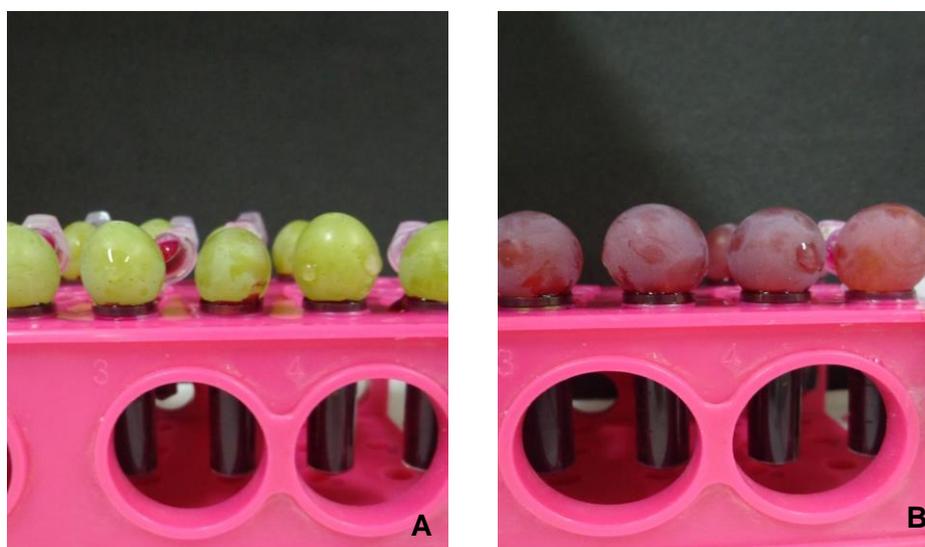


Figura 6. Método de absorção de corante por infusão passiva em bagas da variedade Niagara Rosada. A: bagas com 23 DAA; B: bagas com 78 DAA.

5.3.2. Sistema de capilaridade

Neste sistema, adaptado a partir de Bondada et al. (2005), um gradiente de potencial mátrico entre a superfície do pedicelo contendo o corante e a parte distal (final) da baga foi estabelecido. Da mesma forma que foi realizada para o método de infusão passiva, o cacho foi imerso em água, para evitar embolismo e cada baga foi destacada do cacho, com pedicelo. Em seguida, aproximadamente 2 mm da parte distal da baga foram cortados usando-se uma lâmina de bisturi e a baga colocada com a superfície plana cortada diretamente em contato com um material absorvente ('A/ways' normal ultrafino, São Paulo, Brasil), o que possibilitava a formação do gradiente mátrico. A partir da existência de um gradiente (diferença de pressão), o corante pôde se movimentar pelos vasos xilemáticos intactos do pedicelo para a parte distal da baga, sem a necessidade de expor a baga a uma alta pressão.

Um pequeno tubo com as duas extremidades abertas (de diâmetro interno variável, de acordo com o diâmetro do pedicelo e do seu estágio de desenvolvimento), foi inserido no pedicelo de cada baga, servindo como um reservatório para a solução de corante que ficava em contato com o pedicelo (Figura 7). O preenchimento do tubo com o corante foi feito de forma que a

extremidade cortada do pedicelo ficasse totalmente imersa. Para evitar o vazamento do corante, o pequeno tubo foi selado com lanolina entre a superfície da baga e a extremidade proximal do pedicelo.

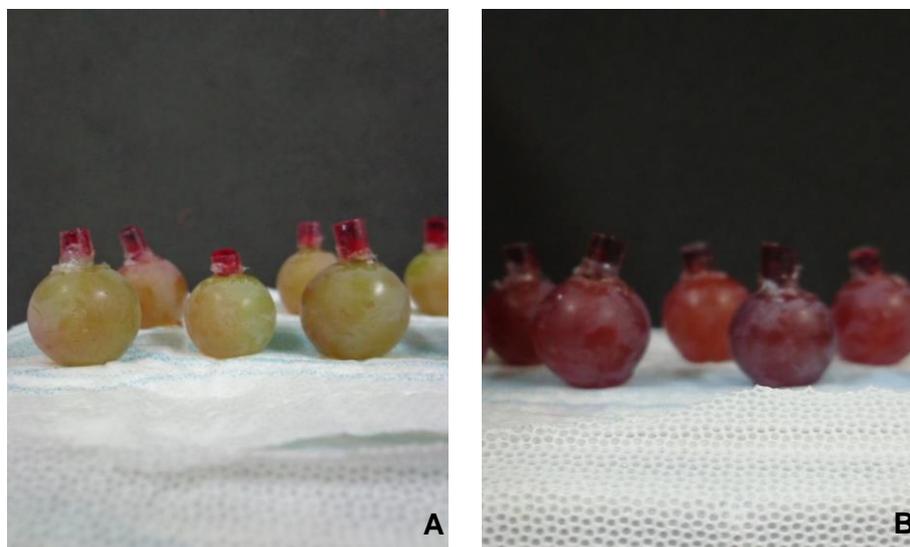


Figura 7. Método de absorção do corante por sistema de capilaridade em bagas da variedade Niagara Rosada. A: bagas com 64 DAA; B: bagas com 85 DAA.

Após um período de cinco horas, as bagas foram retiradas do sistema, para observação dos traços do corante pelos vasos xilemáticos das bagas intactas e, em seguida, foram feitos cortes transversal e longitudinal com lâmina de bisturi, para avaliação visual da existência de corante nos vasos periféricos e nos vasos centrais, próximos às sementes. Os cortes foram observados por estereoscópio modelo Luxeo 4D Labomed, com sistema de zoom de 4:4:1, com câmera digital acoplada de 5 MP e as imagens capturadas pelo auxílio do software PixePro TM. Cerca de 0,5-0,7 mm da extremidade distal, a qual ficou em contato com o capilar (material absorvente), sido removida antes da avaliação visual para eliminar qualquer coloração que pudesse proveniente da difusão lateral do corante na superfície do capilar.

5.4. Avaliação do efluxo (backflow)

Para testar se água poderia se mover da baga para a planta-mãe através dos vasos xilemáticos (efluxo), o corante fucsina ácida foi utilizado em bagas de cachos intactos. As avaliações iniciaram quando as bagas tinham em torno de 10

DAA e foram realizadas semanalmente até os 95 DAA, por método adaptado ao utilizado por Tilbrook e Tyerman, (2009).

Uma baga de cada cacho ainda ligado à planta-mãe teve a parte final do pericarpo removida em água com o uso de uma lâmina de bisturi para expor os feixes vasculares periféricos (dorsal) e axiais (central) e o corte final de cada baga foi colocado em contato com uma solução de fucsina ácida a 0,1% (infusão "reversa" de corante) onde, tubos *Eppendorf* serviram de reservatório para o corante que ficou em contato com a baga (Figura 8 A).

Após cinco horas os ramos foram cortados da planta-mãe, as bagas retiradas do corante e levada para o laboratório. Foram realizados cortes transversais e longitudinais nas bagas que estiveram em contato com o corante, pedicelos, ráquis e em nós do ramo das bagas expostas à fucsina ácida (Figura 8 B). Para examinar se houve movimentação do corante no sentido reverso (efluxo), os cortes foram observados por estereoscópio modelo Luxeo 4D Labomed, com sistema de zoom de 4:4:1, com câmera digital acoplada de 5 MP e as imagens capturadas pelo auxílio do software PixePro TM.

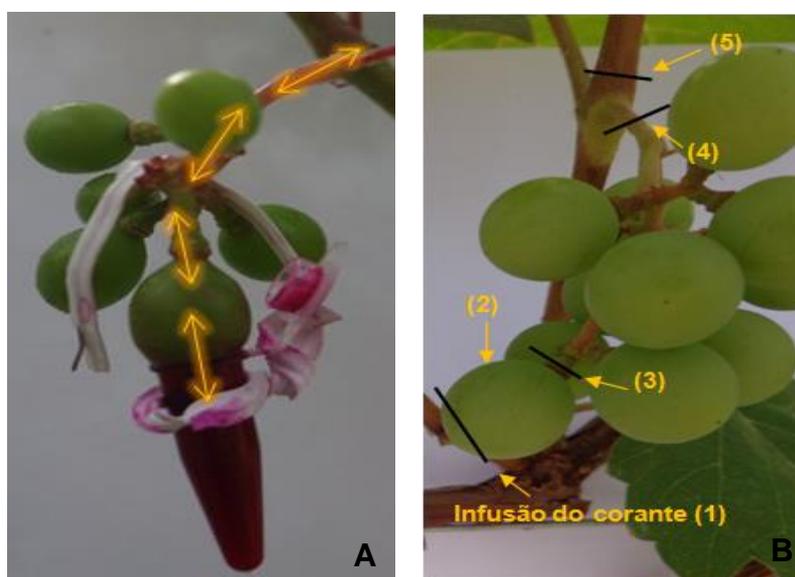


Figura 8. A: Método de absorção do corante por infusão reversa. B: Esquema exemplo do movimento do corante em contato com a baga da variedade Niagara Rosada. Uma pequena seção distal era removida e posta em contato com o corante (1). Cada flecha representa um local onde os cortes eram realizados para avaliação da presença ou ausência do corante ao longo do cacho. (2) – corte longitudinal ou transversal na baga; (3) – cortes transversais em toda a extensão do pedicelo; (4) – cortes transversais ao longo da ráquis; (5) - cortes transversais logo acima e abaixo do primeiro nó.

5.5. Vitalidade celular do mesocarpo

As avaliações iniciaram quando as bagas tinham em torno de 10 DAA e foram realizadas semanalmente até os 95 DAA. Para essa análise, os cachos colhidos foram colocados em sacos plásticos sob resfriamento para evitar perdas por transpiração e levados para o laboratório, onde 10 a 15 bagas foram destacadas e cortadas ao meio longitudinalmente entre as sementes. Uma metade de cada baga foi espremida e o suco coletado para medir os sólidos solúveis totais.

Para a análise de vitalidade celular, segundo metodologia de Jones e Senft,(1985); Krasnow et al. (2008); Tilbrook e Tyerman, (2008); Fuentes et al. (2010); Bonada et al. (2013), a solução de um corante fluorescente, FDA (Diacetato de Fluoresceína) foi utilizada para coloração das células do mesocarpo das bagas. A solução foi preparada com a adição de 2 µl de uma solução de estoque 4,8 mM de FDA (em acetona) para 1 ml de solução de sacarose equilibrada para, aproximadamente, o mesmo teor de sólidos solúveis que as bagas. No prazo de dez minutos após ter sido feita, cerca de 250 µl da solução foram colocados sobre toda a superfície das metades cortadas de cada baga e mantidas no escuro durante pelo menos 20 minutos, para permitir a absorção do corante antes da visualização. A fluorescência do FDA no mesocarpo das bagas cortadas foi visualizada com auxílio de um estereoscópio modular com zoom de 8x Zeiss Stereo Discovery V8. As imagens digitais foram, então, processadas com auxílio do software Zeiss Axio Vision acoplado ao estereoscópio.

5.5.1. Determinação da área como vitalidade celular

A partir das imagens processadas com auxílio do software Zeiss Axio Vision, foi possível, com auxílio do software (NIH) Image-J, calcular a área total do mesocarpo das bagas. A partir da área total, a área fluorescente e não fluorescente foram estimadas, para então, calcular a porcentagem de perda de vitalidade celular ao longo do desenvolvimento das bagas.

5.6. Análises qualitativas do desenvolvimento das bagas

As análises de peso, sólidos solúveis totais, coloração e deformabilidade foram realizadas utilizando-se 10 bagas por avaliação. As avaliações iniciaram

quando as bagas tinham, em torno de, 10 DAA e foram realizadas semanalmente até os 95 DAA.

5.6.1. Peso e sólidos solúveis totais

O peso de cada baga, retiradas da parte proximal, média e distal dos cachos foi registrado individualmente com balança modelo FA-2104N, Bioprecisa. O suco de cada baga utilizada na medição do peso foi coletado individualmente para avaliação do teor de sólidos solúveis totais, utilizando um refratômetro digital, com compensação de temperatura, modelo DRBS-300, França.

5.6.2. Coloração da casca

As medições da coloração da casca das bagas foram realizadas utilizando-se um colorímetro portátil (Chroma Meter, modelo CR-300, Minolta), a partir do valor do atributo, ângulo de *corhue*, segundo as coordenadas CIELAB. Seguindo a descrição de McGuire (1992).

5.6.3. Deformabilidade das bagas

A deformabilidade das bagas foi medida por meio do ponto médio do fruto, no ponto mais largo, usando um texturômetro modelo TA-XT express (Stable Micro Systems), que exerce uma força constante gerada por uma mola. Esse método possibilita o cálculo da porcentagem de deformação em bagas individuais a partir da força exercida sobre os frutos em resposta a diminuição do diâmetro causada pela força aplicada. Neste trabalho a força aplicada foi 2,5N por um período de 5 segundos.

5.6.4. Diâmetro das bagas em desenvolvimento

Bagas da parte proximal, média e distal de cachos em diferentes videiras, representativas de toda área experimental (n=12), foram marcadas e o registro iniciado aos 10 DAA. O diâmetro foi medido com paquímetro digital modelo Digital Caliper a cada dois dias até os 95 DAA.

5.7. Análise estatística

O delineamento empregado para os resultados das variáveis, peso, sólidos solúveis totais, deformabilidade das bagas e colocação da casca foi o inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições. Para a variável diâmetro foi

utilizado DIC com 12 repetições. Já para análise da taxa de perda de vitalidade celular foi utilizado DIC com 5 repetições.

Para a interpretação dos resultados, a determinação da significância dos dados foi analisada estatisticamente por meio de ANOVA (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa computacional Assistat (Silva e Azevedo, 2002). Diferenças entre as médias foram consideradas significativas a 1%, sendo representadas por $*P < 0.01$. Os dados foram apresentados em tabelas e gráficos apropriados como valores médios \pm erro padrão.

6. RESULTADOS

6.1. Dinâmica do amadurecimento da baga

O crescimento das bagas seguiu um padrão de desenvolvimento baseado em uma sigmoide dupla (figura 9), visto pela mudança no diâmetro, sendo possível perceber um período com crescimento mais lento (etapa II, dos 45 até os 51 dias após a antese, DAA) entre as duas fases de crescimento eminente (etapa I: formação e crescimento das bagas e etapa III: retorno do crescimento e alterações das propriedades químicas das bagas).

O diâmetro máximo foi atingido, aproximadamente, aos 76 DAA, com valor médio de 15,87 mm, a partir dessa etapa houve uma leve e gradativa diminuição, de forma que aos 85 DAA as bagas estavam com, aproximadamente, 15,71mm e diminuíram para 15,51 mm de diâmetro até os 92 DAA. A mudança de cor aconteceu gradativamente do verde para rosado e, segundo os dados de ângulo *hue* (H), que mede a mudança na coloração da casca, apresentou uma diminuição no valor de H, passando de 117 H aos 10 DAA para 1,98 H aos 85 DAA. O decréscimo do H é tido com um indicador do avanço no amadurecimento dos frutos (Figura 9).

O peso de matéria fresca médio das bagas aumentou gradativamente sendo que aos 51 DAA houve um acréscimo expressivo, passando de 2,11g para 2,77g aos 58 DAA. O peso máximo das bagas foi em média de 4,18g, alcançando em torno dos 85 DAA, quase 10 dias depois de o diâmetro máximo ter sido atingido (Figura 10).

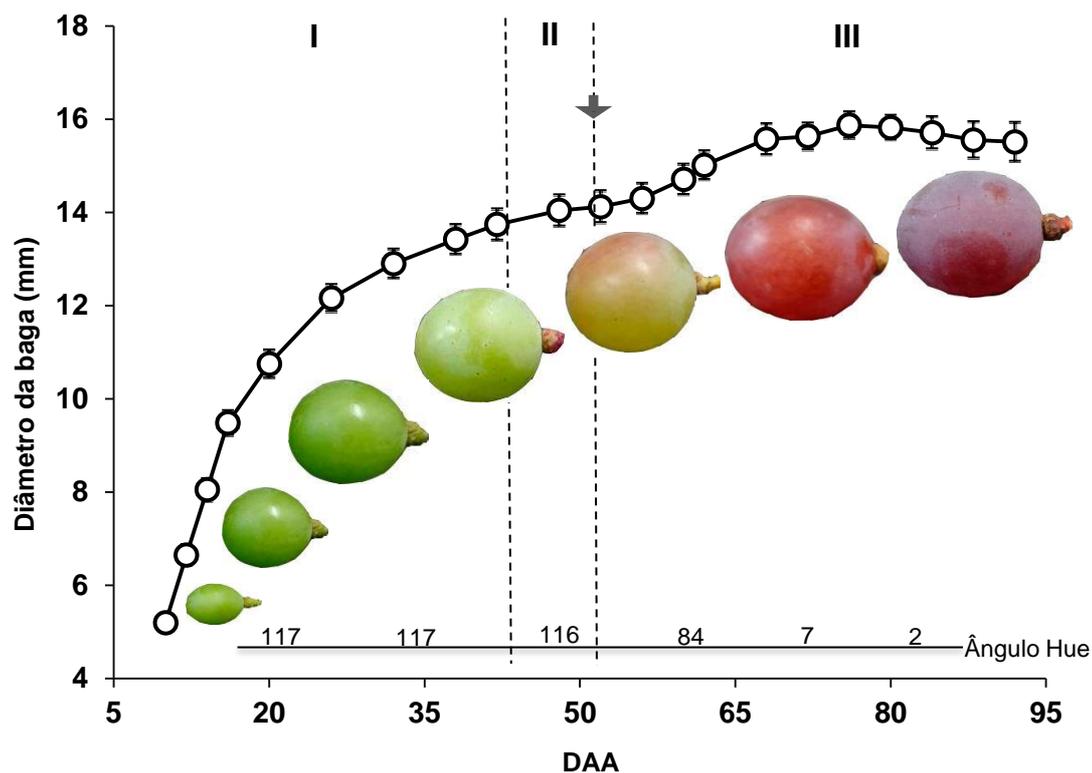


Figura 9. Diâmetro e coloração da casca de bagas da variedade Niagara Rosada em intervalos de dias após a antese. O tamanho das imagens foi calculado a partir do tamanho real das bagas em diferentes fases de desenvolvimento. As duas linhas verticais pontilhadas indicam os limites estimados das três etapas de desenvolvimento: I: crescimento rápido; II: pouco crescimento; III: retorno do crescimento. A seta indica o *veraison*, transição da fase II para o III.

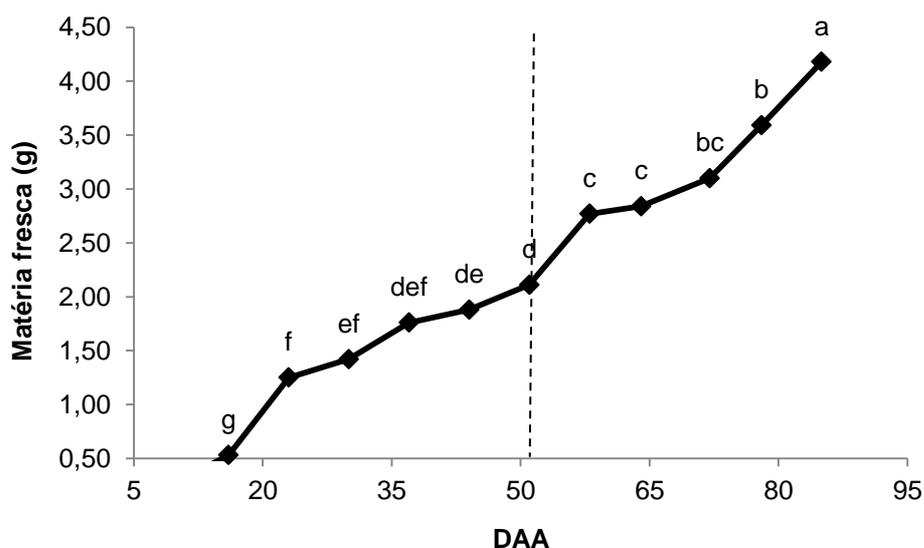


Figura 10. Peso de matéria fresca (g) durante o desenvolvimento de bagas da variedade Niagara Rosada ($n=10$). A linha vertical pontilhada representa o *veraison*. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P<0,01$).

A transição da segunda para a terceira fase, que indica o início do amadurecimento, foi definida pelo ponto de inclinação da curva de sólidos solúveis e de deformabilidade das bagas ao longo do tempo, ocorrendo aos 51 DAA (Figura 11). A taxa de sólidos solúveis acumulada aumentou durante o desenvolvimento, passando de 6,6 °Brix aos 51 DAA para 11,48 °Brix aos 58 DAA até alcançar 20°Brix aos 85 DAA, quando as bagas atingiram o amadurecimento completo (Figura 11).

O amolecimento das bagas foi comprovado pelo aumento da porcentagem de deformabilidade durante o amadurecimento das bagas. A mudança na deformabilidade ocorreu a partir dos 51 DAA, quando a porcentagem passou de zero, aplicando-se uma força de 2,5 N, para valores de 6,87% aos 58 DAA, aumentando para 9,44% aos 85 DAA (Figura 11).

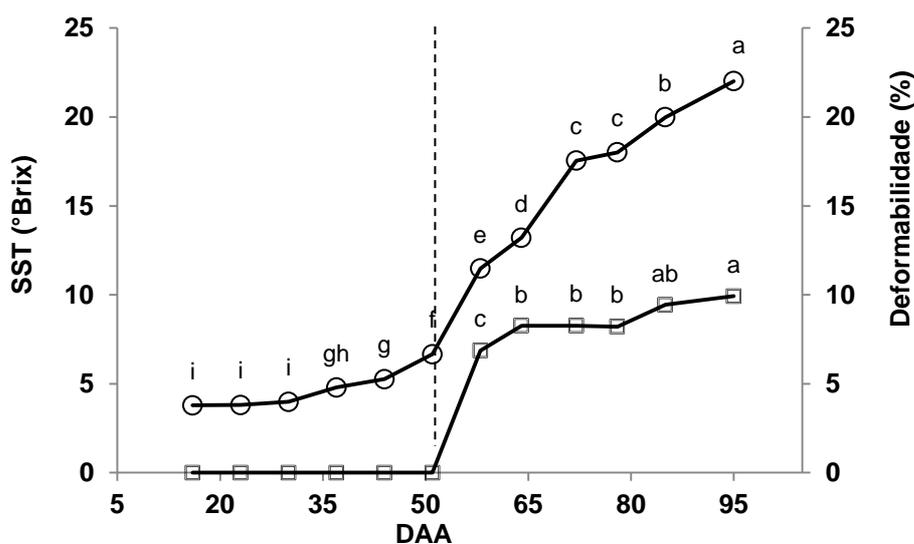


Figura 11. Sólidos solúveis totais (°Brix) e deformabilidade (%) durante o desenvolvimento de bagas da variedade Niagara Rosada. (n=10), em dias após a antese (DAA). A linha vertical pontilhada representa o *veraison*. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P<0,01).

A tabela 1 apresenta o resumo da análise de variância para as características de desenvolvimento das bagas. Todas as variáveis analisadas apresentaram diferença significativa ao longo do tempo em dias após a antese.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis, sólidos solúveis totais (SST), deformabilidade, diâmetro, peso e ângulo *Hue*, avaliadas semanalmente, dos 10 aos 95 dias após a antese, em bagas da variedade Niagara Rosada.

FV	QM				
	SST (°Brix)	Deformabilidade (%)	Diâmetro (mm)	Peso (g)	Hue (h*)
Fase	486.9**	14.70**	72.00**	14.27**	24376.90**
Resíduo	0.268	1.02	1.19	0.13	42.43
Média	10.40	8.7	13.22	2.14	86.19
CV (%)	4.98	11.49	8.27	16.64	7.56

QM = quadrado médio; ** = Significativo a 1% de probabilidade pelo teste Tukey.

6.2. Funcionalidade do xilema (influxo)

As imagens obtidas com a utilização do marcador xilemático, fucsina ácida, mostraram uma clara movimentação do corante, por influxo, durante a primeira fase de crescimento das bagas pelos vasos periféricos e axiais do xilema, até o início do amadurecimento (51 DAA), tanto por método de infusão passiva (Figura 12 L e Q) quanto por sistema de capilaridade (Figura 12 B e G). A partir dos 58 DAA houve uma diminuição no movimento do corante para os dois métodos de absorção (Figura 12 C e H: sistema de capilaridade; M e R: Infusão passiva), em que a coloração dos vasos xilemáticos ocorreu apenas até a porção mediana da baga. Em torno dos 64 DAA, a absorção do corante cessou para o método de infusão passiva, comprovando a existência de uma mudança no fornecimento de água via xilema da videira para a baga.

Com a utilização do método de absorção do corante por capilaridade, do qual forma-se um gradiente hidrostático entre o pedicelo e a parte distal da baga, foi possível observar a continuidade da movimentação do corante para os vasos periféricos, além dos axiais, mesmo após a absorção ter parado completamente em bagas submetidas ao método de infusão passiva (Figura 12, D e I: sistema de capilaridade; N e S: Infusão passiva aos 64 DAA).

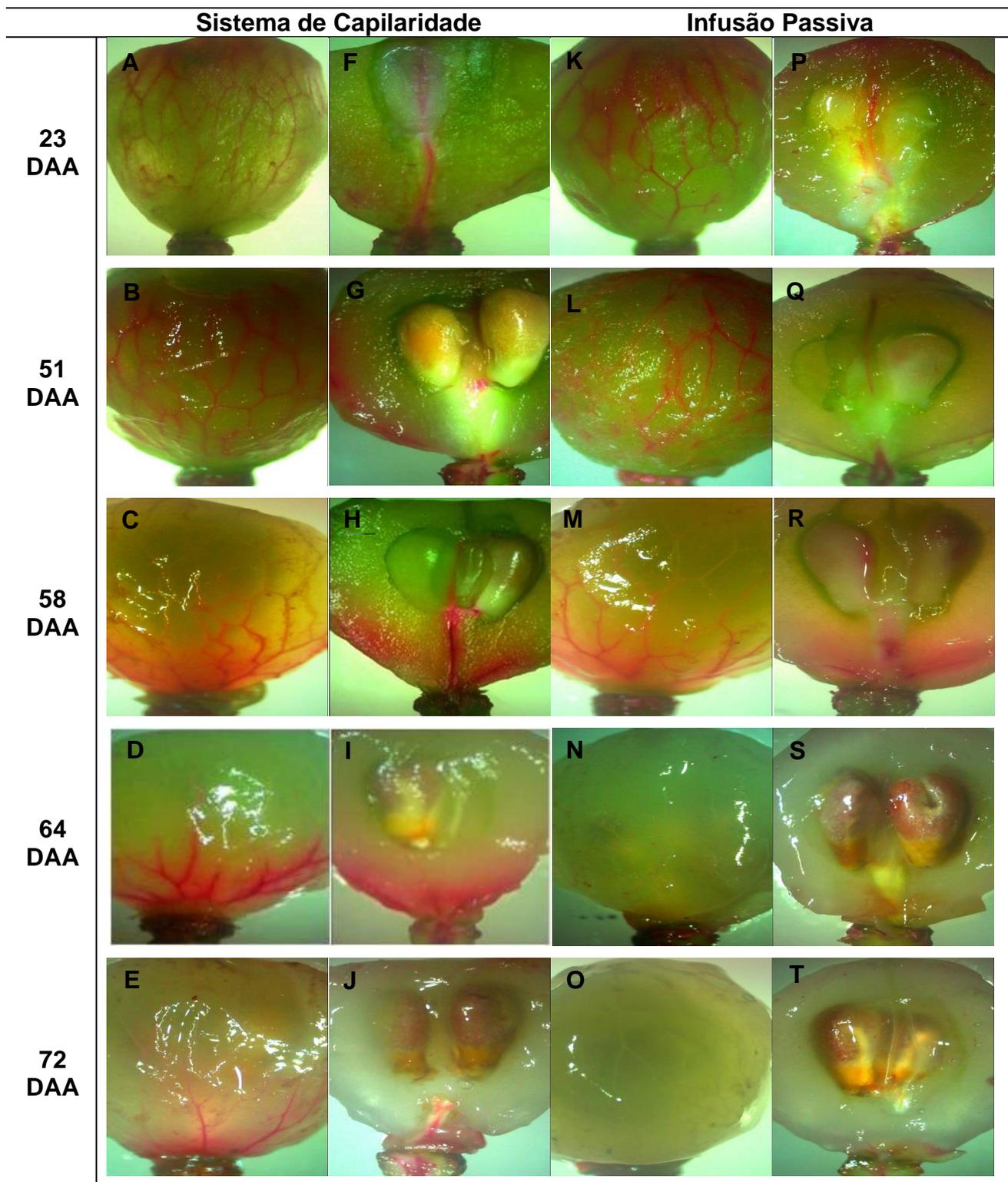


Figura 12. Imagens de bagas da variedade Niagara Rosada coradas com fucsina ácida por sistema de capilaridade (A - E, bagas inteiras; F - J, bagas cortadas longitudinalmente) e por sistema de infusão passiva (K - O, bagas inteiras; P - T, bagas cortadas longitudinalmente).

O gradiente hidrostático formado, pelo método de absorção por capilaridade, em ausência de qualquer pressão imposta (visto que, o método utilizado não exerce nenhuma pressão no xilema/fruto, além da pressão atmosférica normal), tornou possível a movimentação do corante para a região de vasos periféricos e axiais, próximos a região do *brush* (feixe vascular central ou axial que provem do pedicelo e adentra na baga) até, aproximadamente os 72 DAA (Figura 12 E e J). Após esse período, mesmo utilizando o método de capilaridade, nenhum traço de corante foi encontrado nos vasos xilemáticos das bagas, nem em regiões periféricas ou axiais.

Com a utilização desses dois métodos, ficou perceptível que, a resistência à entrada de água na baga via xilema pode ser um resultado da diminuição da pressão necessária para movimentar a água e não simplesmente uma interrupção física ou quebra dos traqueídes, uma vez que, no método de absorção por capilaridade, onde há influência da pressão atmosférica, o corante movimentou-se pelos feixes xilemáticos, por um período maior durante o desenvolvimento das bagas do que pelo método de infusão passiva.

6.3. Efluxo de água através do xilema da baga

A absorção do corante por infusão reversa mostrou a existência de efluxo durante a primeira fase de crescimento das bagas, dado que, a água pôde se movimentar rapidamente, da parte distal da baga e por todo o cacho até os 58 DAA. Com o início do amadurecimento a movimentação do corante, via xilema, cessou na ráquis, pedicelo, assim como nos vasos xilemáticos da baga, que esteve em contato com o corante (Figura 13). A presença ou ausência do corante em cada uma das partes avaliadas durante o seu desenvolvimento (10 aos 95 DAA) está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Efluxo de água da baga para planta-mãe. Avaliação da presença (+) ou ausência (-) de fucsina ácida nos vasos xilêmáticos de bagas, pedicelos, ráquis e ramos durante o desenvolvimento de bagas da variedade Niagara Rosada.

	10 DAA	37 DAA	58 DAA	64 DAA	85 DAA	95 DAA
Baga	+	+	+	-	-	-
Pedicelo	+	+	+	-	-	-
Ráquis	+	+	-	-	-	-
Ramo	-	-	-	-	-	-

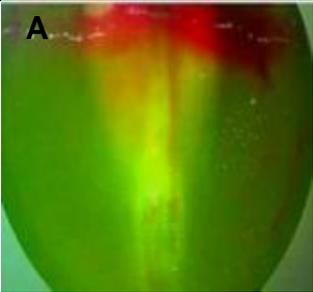
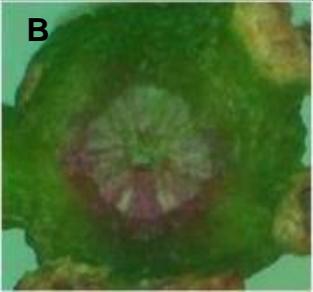
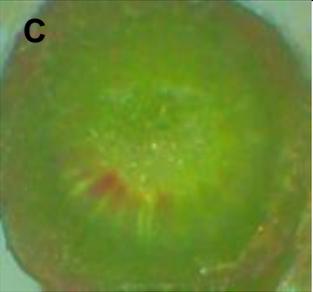
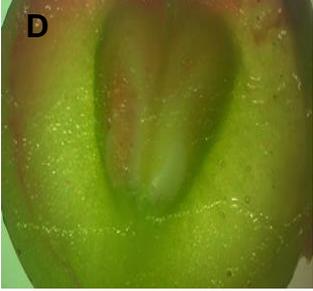
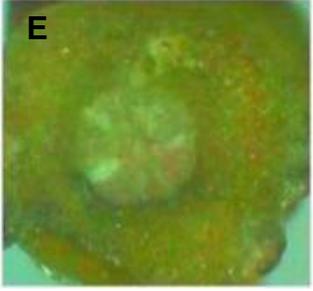
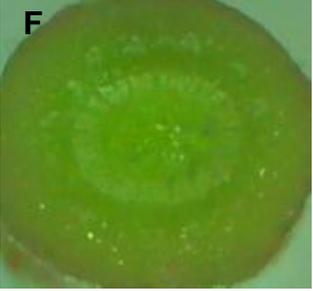
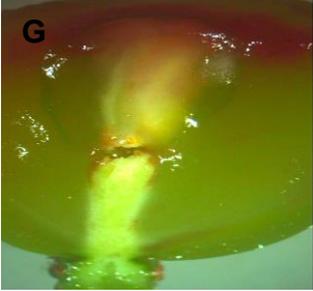
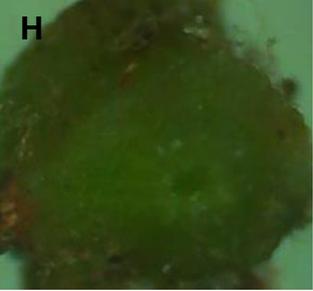
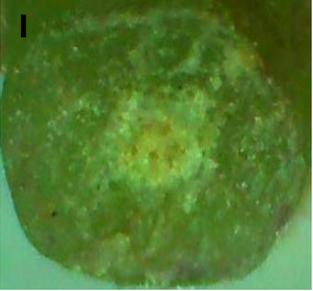
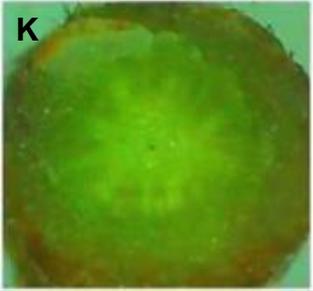
	Baga	Pedicelo	Ráquis
37 DAA			
58 DAA			
64 DAA			
95 DAA			

Figura 13. Bagas coradas com fucsina ácida por infusão reversa. Efluxo perceptíveis em bagas da variedade Niagara Rosada. (A), pedicelos (B) e ráquis (C) aos 37 DAA. Aos 58 DAA a coloração ficou restrita as bagas (D) e pedicelos (E), não houve movimento de corante a partir da ráquis (F). Nenhuma coloração foi encontrada em bagas (G), pedicelos (H) ou ráquis (I) a partir dos 64 até 95 DAA (J, K e L).

As imagens da movimentação da água via xilema da parte final das bagas em direção ao ramo, feita ao longo de toda a extensão do cacho, revelaram que o corante movimentou-se da parte distal para bagas (exclusivamente as que estiveram em contato com o corante), pedicelos e ráquis durante a primeira fase de crescimento (Figura 13 A, B e C, respectivamente, aos 37 DAA).

Com o início do amadurecimento (58 DAA), a movimentação do corante ficou restrita a bagas e pedicelos, onde a coloração foi visível, porém, não foram encontrados traços de fucsina ácida a partir da ráquis (Figura 13 D, E e F, respectivamente). A partir dos 64 DAA (Figura 13 G, H e I), nenhuma coloração foi encontrada nas bagas, pedicelos ou ráquis. A Figura 13 J, K e L revela imagens das bagas pós-amadurecimento (95 DAA) sem corante nas bagas, pedicelos ou ráquis. Durante as avaliações nenhum traço de corante foi encontrado nos nós ou ramos a partir do pedúnculo, mesmo em *pré-veraison*. Portanto, as imagens revelaram que o efluxo ocorreu durante a primeira fase de crescimento e cessou ainda no início do amadurecimento das bagas.

6.4. Vitalidade das células do mesocarpo

As imagens do mesocarpo de bagas cortadas longitudinalmente e coradas com uma solução FDA mostram uma evidente perda de vitalidade celular no início do amadurecimento.

A Figura 14 A e E; B e F mostram o mesocarpo de bagas com fluorescência, presumidamente, com vitalidade celular aos 10 e 37 DAA, respectivamente. Já aos 58 DAA e aos 85 DAA (Figura 14 C e G; D e H, respectivamente) não há mais fluorescência eminente, comprovando a perda da integridade da membrana e a perda de vitalidade das células do mesocarpo ainda no início do amadurecimento e intensificado até o amadurecimento completo.

O gráfico da porcentagem média da área com vitalidade celular no mesocarpo ao longo do desenvolvimento das bagas é apresentado na Figura 15. Para a realização do cálculo de porcentagem de vitalidade celular, as áreas com e sem fluorescência na superfície do mesocarpo das bagas, foram traçadas e medidas com auxílio de um software de análise de imagens, como mostrado na Figura 16.

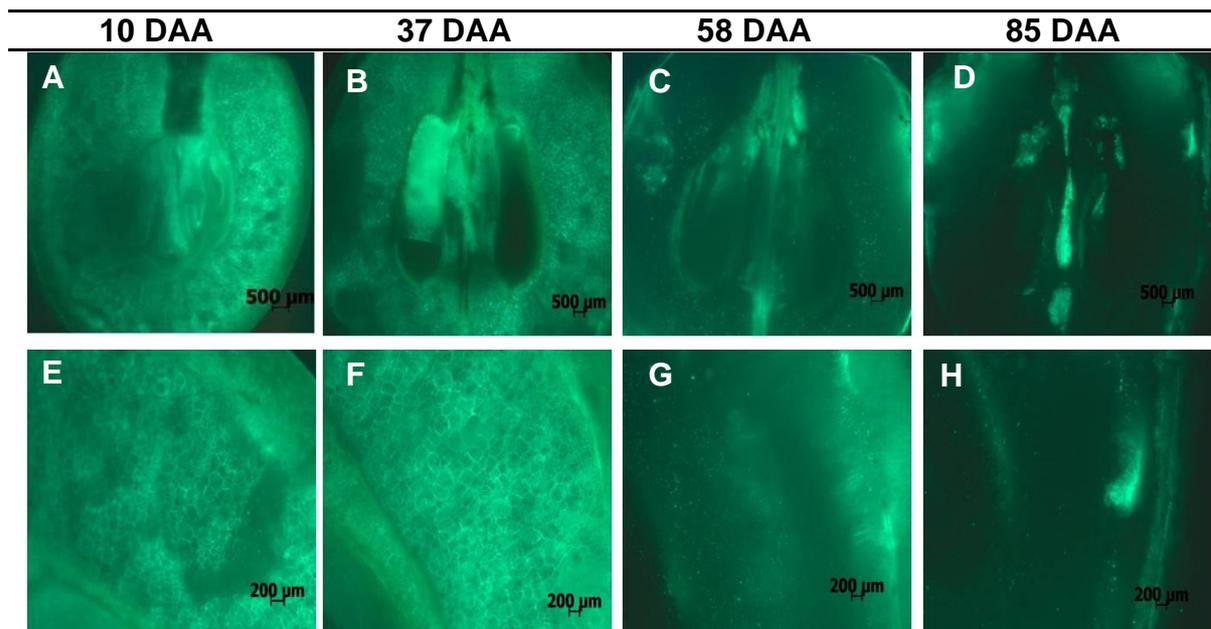


Figura 14. Bagas da variedade Niagara Rosada cortadas longitudinalmente, coradas com Diacetato de Fluoresceína, evidenciando a área fluorescente (com vitalidade celular) aos 10 e 37 dias após a antese (A e B, respectivamente) e não fluorescentes (sem vitalidade celular) aos 58 e 85 dias após a antese (C e D, respectivamente). E até H são imagens aproximadas, respectivas ao canto superior de cada imagem exposta acima delas.

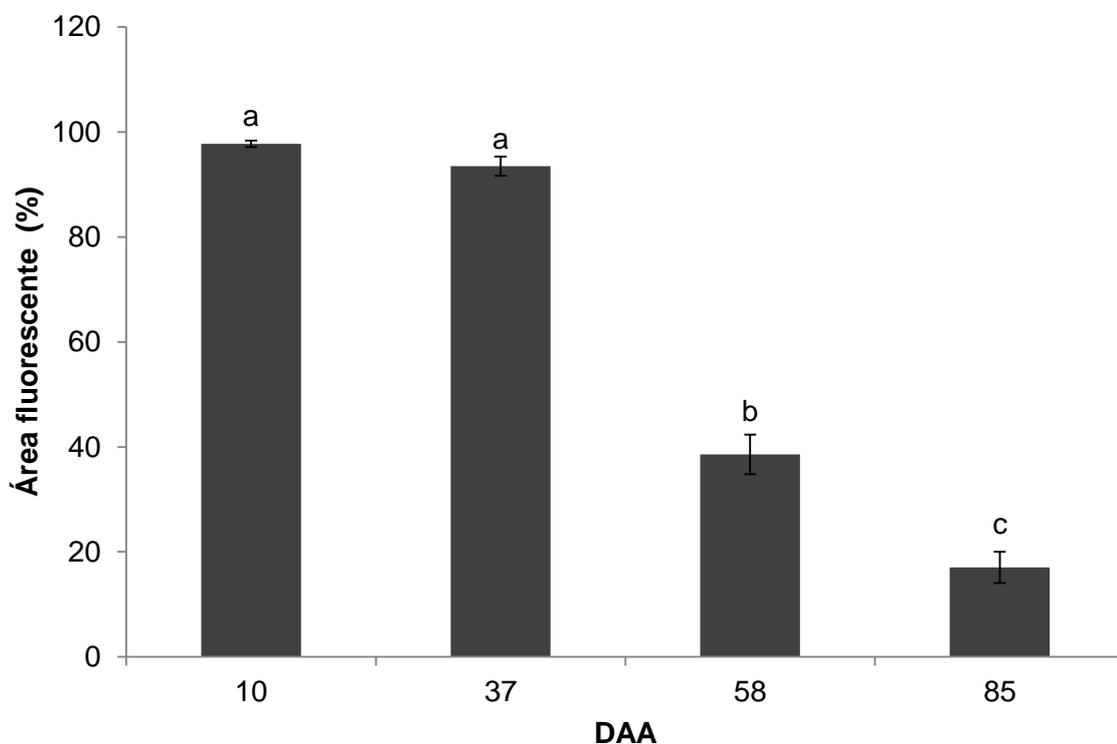


Figura 15. Porcentagem de área fluorescente (com vitalidade celular) do mesocarpo ao longo do desenvolvimento de bagas da variedade Niagara Rosada em dias após a antese. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,01$).

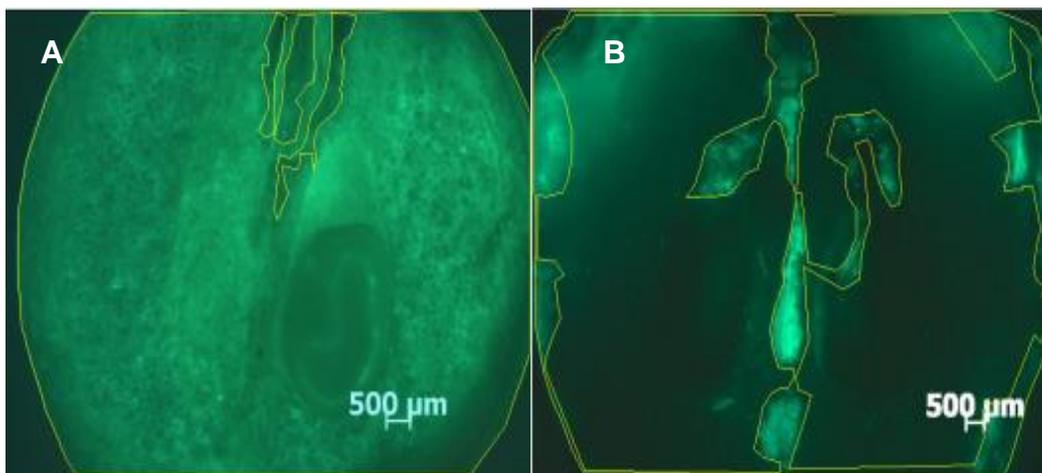


Figura 16. Exemplo de bagas da variedade Niagara Rosada coradas com Diacetato de Fluoresceína mostrando a área, traçada a mão, com ou sem fluorescência. A - baga aos 10 DAA, apenas uma pequena porção sem fluorescência foi circulada (1.7%). B - baga aos 85 DAA, grande parte do mesocarpo foi circulado (83%) representando as áreas sem fluorescência (sem vitalidade celular).

As bagas exibiram uma gradual perda de vitalidade celular percebida inicialmente, na porção interna do fruto, próxima às sementes, se expandindo para grande parte da superfície das bagas ao longo do desenvolvimento. A região do brush (Figura 14 C e D) se manteve fluorescente até o final do amadurecimento das bagas, presumindo-se, então, a existência de vitalidade celular em tal região.

As porcentagens de área com vitalidade celular variaram entre valores médios iniciais de 97% aos 10 DAA, diminuindo para 17% aos 85 DAA (Figura 15). Ocorreu, portanto, uma perda de vitalidade de, aproximadamente, 82% durante o ciclo de desenvolvimento, desde o início do crescimento das bagas até atingirem o amadurecimento.

Como esperado, a vitalidade celular teve correlação negativa com as variáveis peso, deformabilidade e sólidos solúveis totais (Tabela3). Ou seja, à medida que diminuía a vitalidade celular do mesocarpo, o peso, deformabilidade e sólidos solúveis das bagas aumentavam.

Tabela 3. Coeficiente de correlação linear de Pearson (r) entre vitalidade celular do mesocarpo (VCM) e as variáveis peso, deformabilidade (DEF) e sólidos solúveis totais (SST) avaliadas ao longo do desenvolvimento de bagas da variedade Niagara Rosada.

Correlação	Coeficiente de correlação (r)	Significância
PESO xVCM	-0.8788	**
DEF x VCM	-0.9830	**
SST x VCM	-0.9823	**

** significativo a 1% de probabilidade

7. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho, a partir da movimentação de corante via xilema, para dentro (influxo) e para fora (efluxo) da baga e de vitalidade celular do mesocarpo, fornecem as primeiras informações para a variedade Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.), sobre as aparentes mudanças hidráulicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento e amadurecimento das bagas. Os estudos descritivos realizados a partir do uso de corantes indicaram que, para essa variedade, o aumento da resistência à entrada de água através dos vasos xilemáticos ocorreu visivelmente no início do amadurecimento (Figura 12) e está associada à perda de integridade da membrana das células do mesocarpo, uma vez que, o uso do FDA comprovou a perda de vitalidade celular do mesocarpo de Niagara Rosada quando essas iniciaram o amadurecimento (Figura 14).

A avaliação de influxo de água nas bagas foi realizada, nesse trabalho, por dois métodos descritivos, sistema de absorção por capilaridade e infusão passiva. Além desses dois métodos, Bondada et al. (2005) utilizaram, também, o método de pressão de membrana, impondo uma pressão hidrostática negativa conhecida sobre os tecidos apoplásticos do mesocarpo e concluíram que, para a variedade Chardonnay, o uso tanto do método de pressão de membrana quanto o sistema de capilaridade, resultaram no mesmo padrão de movimentação de água pelos vasos xilemáticos, comprovando que os feixes xilemáticos estariam intactos e

sem a presença de embolismo, porém com uma substancial diminuição no fluxo de água para a baga.

Assim, a observação da movimentação do corante pelo método de formação de gradiente, sem utilização de aparelhos de pressão, se fez essencial nesse experimento de caracterização da variedade Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) para a compreensão da influência da perda de vitalidade das células do mesocarpo como um possível responsável pela mudança no fluxo de água para bagas, durante o amadurecimento das bagas.

O fluxo de água via xilema, da planta-mãe para a baga ocorre devido à formação de um gradiente de pressão negativa no apoplasto, que diminui ao longo do amadurecimento (Bondada et al., 2005). Esse padrão tem sido comprovado não apenas em variedades de uva, mas também em outros frutos como cereja (Clearwater et al., 2012) e kiwi (Brüggenwirth et al., 2015). A tensão criada no xilema, em resposta ao gradiente de pressão negativa, só é mantida por causa da existência de uma forte pressão osmótica, consequência da integridade e capacidade seletiva da membrana celular no mesocarpo (Bondada et al., 2005).

A integridade das membranas celulares foi evidente em mais de 95% da área do mesocarpo das bagas de Niagara rosada até os 58 DAA, quando a taxa de perda de vitalidade celular aumentou e o fluxo de água, via xilema, para a baga diminuiu. Ao longo do desenvolvimento, se a integridade da membrana for perdida, tendo como consequência a perda de vitalidade celular do mesocarpo, mesmo com a existência de um potencial osmótico fortemente negativo no apoplasto, pode-se esperar que o movimento de água, via xilema, para a baga diminua (Tilbrook e Tyerman, 2008). Para se ter ideia, Tyerman et al. (2004) ao observarem o influxo de água para a baga por medidas diretas, sugeriram a existência de um estado estacionário de absorção de água em bagas pós-*veraison* e um possível equilíbrio da pressão hidrostática entre xilema do pedicelo e o xilema da planta-mãe. A existência de um equilíbrio de pressão hidrostática, também no apoplasto da baga, é apropriada para explicar a relação entre a perda de vitalidade celular e a diminuição do influxo e efluxo de água via xilema, encontrado para Niagara Rosada no início do amadurecimento.

Nos resultados aqui apresentados, o início do amadurecimento foi registrado, aproximadamente, aos 51 DAA, quando as bagas tornaram-se amolecidas e com súbito aumento nos sólidos solúveis totais (Figura 11). Houve

também, no início a mudança de cor, o retorno do crescimento das bagas (Figuras 9 e 10), mesmo com o decréscimo do fluxo de água via xilema a partir desse período (Figura 12 C e H; M e R). Esse crescimento pode ser explicado, pela redução do potencial hídrico da baga, como consequência do acúmulo de açúcares, fornecidos via floema (Zhaosen et al., 2014).

Juntamente com as mudanças químicas, Thomas et al. (2006) demonstraram que a pressão de turgescência também é alterada, tornando-se mais reduzida. Resultados similares foram encontrados em estudos como cereja (Knoche et al., 2014; Schumann et al., 2014), que da mesma forma que a uva, também, apresenta uma diminuição na condutância hidráulica ao longo do amadurecimento do fruto (Brüggenwirth et al., 2015).

A perda de turgescência, a partir do *veraison*, corresponde ao aumento na deformabilidade em bagas pós-*veraison*, justamente quando algumas variedades podem apresentar uma considerável perda de peso (McCarthy e Coombe 1999; Thomas et al., 2006; Sadras e McCarthy 2007). A perda de peso pode estar ligada à perda de integridade das membranas celulares do mesocarpo e à consequente perda de turgescência celular. A partir desta afirmação, foi proposta a existência de uma correlação positiva entre a perda de peso e a perda de vitalidade celular em bagas pós-*veraison* (Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008; Fuentes et al., 2010).

Para a variedade Syrah, especificamente, essa correlação foi evidente, enquanto outras variedades como Chardonnay e Thompson Seedless não apresentaram o mesmo padrão (Fuentes et al., 2010). A Variedade Niagara Rosada parece não seguir esse padrão, dado que, apesar das bagas terem apresentado aumento progressivo na deformabilidade, a partir dos 51 DAA a perda de tamanho foi muito sutil até o final do amadurecimento, mesmo com a evidência de aumento na taxa de perda de vitalidade celular durante o amadurecimento. Houve elevada correlação negativa entre a vitalidade celular do mesocarpo e o peso, a deformabilidade e os sólidos solúveis totais, ou seja, mesmo com a perda de vitalidade celular, as outras variáveis apresentaram aumento progressivo até o final do amadurecimento (Tabela 3).

Após as bagas atingirem o seu tamanho máximo, com 15,87 mm de diâmetro em torno dos 76 DAA, houve um leve declínio de 0,36mm de diâmetro até os 92 DAA (Figura 9), o que resultou em perda de 2,27% do seu tamanho

máximo, até esse período, quando as bagas de Niagara Rosada já se apresentavam sobremaduras, da mesma forma, o peso de matéria fresca continuou aumentando até o amadurecimento completo das bagas (Figura 10). O resultado de perda de 2,27% do tamanho, em diâmetro, registrado para Niagara Rosada é imperceptível quando comparado com bagas de outras variedades. Em Syrah, por exemplo, a perda pode chegar até 30% do seu peso máximo antes de atingir o amadurecimento completo (McCarthy e Coombe, 1999; Tyerman et al., 2004; Rogiers et al., 2006; Fuentes et al., 2010). A sutil perda de tamanho encontrada no final do amadurecimento das bagas de Niagara Rosada pode, por sua vez, estar relacionada à diminuição do efluxo de água pelos vasos xilemáticos em resposta à perda de vitalidade das células no mesocarpo das bagas. Em bagas de Syrah conectadas hidraulicamente à planta-mãe, há detecção de efluxo durante na fase pós-veraison (Tilbrook e Tyerman, 2009), com baixa taxa de perda de vitalidade celular (Fuentes et al., 2010). Em Niagara Rosada, o resultado da expressiva perda de integridade da membrana celular, pode ser o suficiente para interromper o influxo e também o efluxo de água, via xilema elevar a um equilíbrio de pressão (osmótica/hidráulica) no apoplasto da baga. Essa condição poderia evitar a perda de peso das bagas durante o amadurecimento.

Para Niagara Rosada o efluxo ocorreu durante a primeira fase de crescimento, mas cessou no início do amadurecimento, a partir dos 58 DAA, conforme Figura 13, diferentemente dos resultados encontrados para as variedades Chardonnay e Syrah. Nestas, o efluxo continuou no pós-*veraison*, cessando a partir dos 97 DAA para Chardonnay e ficando restrito ao pedicelo das bagas de Syrah aos 118 DAA em ciclos, no qual o início do amadurecimento ocorreu aos 70 DAA para Chardonnay e aos 65 DAA para Syrah (Tilbrook e Tyerman, 2009).

Essas diferenças encontradas entre variedades sugerem que as características fisiológicas apresentam variações durante o ciclo de desenvolvimento e que tais respostas devem ser específicas de cada variedade. Para Niagara Rosada, essas alterações resultam em uma resposta positiva na manutenção do tamanho da baga.

A existência de efluxo durante a primeira fase de crescimento das bagas não representa um problema para o desenvolvimento da baga. Uma vez que, nessa fase, existe a tensão apropriada para ocorrer rápido influxo de água para a

baga, de tal forma que, o ganho de água por influxo é maior do que a perda por efluxo e isso provê o aumento de tamanho da baga nessa fase (Iland et al., 2011). Já ao longo do amadurecimento, a diminuição do efluxo e o aumento da perda de vitalidade celular evitam a perda excessiva de água via xilema, assim, o crescimento das bagas fica dependente do influxo de água via floema, considerando que o influxo via xilema, também, torna-se interrompido e o aumento no teor de sólidos solúveis pode ser o responsável pelo ganho de peso fresco das bagas que ocorre até os 85 DAA.

Com o evento do amadurecimento, as bagas da variedade Niagara Rosada tendem a exibir o mesocarpo mais tenro e pouco crocante, provavelmente em resposta à perda de integridade das células, além de ter uma casca espessa e revestida por uma camada de cera, que dificulta a perda de água por transpiração e possibilita a manutenção das suas características físicas e químicas, por um período mais prolongado. Além disso, acredita-se que a interrupção da conexão entre o xilema da baga e o da planta-mãe pode servir como estratégia para evitar perda de água de volta para a planta-mãe e assim, evitar também, a murcha excessiva das bagas, possibilitando a manutenção do tamanho das bagas após o *veraison*.

Entretanto, o amadurecimento de bagas em condições de climas quentes, como foi o caso da uva Niagara Rosada utilizada, pode interferir nas alterações fisiológicas. Altas temperaturas durante o amadurecimento podem causar significativa redução no acúmulo de açúcares e na expansão em bagas a partir do *veraison* (Greer e Weston, 2010; Greer e Weedon, 2013), além de, aumentar a incidência de perda de água através da casca por causa da elevada demanda evaporativa do ambiente (Greer e Rogiers, 2009). Pode, ainda, antecipar o início da morte celular no mesocarpo (Bonada et al., 2013). O efeito da alta temperatura foi testado nas variedades Chardonnay e Syrah, com uso de um sistema que aumenta a temperatura ambiente em volta das videiras. Esse sistema foi suficiente para acelerar e intensificar a taxa de morte celular do mesocarpo durante o amadurecimento para as duas variedades testadas, provavelmente por intensificar a perda de água e a murcha das bagas (Bonada et al., 2013).

Uma antecipação no início da perda de vitalidade celular, em resposta a uma condição de clima mais quente pode justificar a diferença dentro do período desenvolvimento em que as alterações fisiológicas ocorreram para Niagara

Rosada. Parece pertinente que o aumento na taxa de perda de vitalidade celular, ainda no início do amadurecimento das bagas de Niagara Rosada, seja associado às temperaturas elevadas durante o seu amadurecimento. A área experimental encontra-se em uma região de clima tropical (21°S), caracterizado por apresentar temperaturas médias raramente abaixo de 18° C, mesmo nos meses de inverno. Durante o período das avaliações, a temperatura média foi de 26,4°C e a temperatura máxima oscilou entre 30° e 40°C até o final do amadurecimento (Figura 5). Porém, nenhuma avaliação direta ligada a esse fator foi realizada, portanto, mais estudos com foco nesse tema precisam ser realizados para a confirmação de tal hipótese.

Tendo em vista as mudanças fisiológicas, que ocorrem a partir do início do amadurecimento aos 51 DAA, é possível considerar que aconteça o isolamento hidráulico a partir do xilema em bagas de Niagara Rosada. A conexão das bagas com a planta-mãe é rompida, provavelmente, como estratégia para garantir que as bagas completem seu ciclo de desenvolvimento, sem passar por possíveis variações que comprometam o desenvolvimento normal do fruto. A mudança do fluxo de água via xilema pode evitar que a baga seja prejudicada em situações de déficit hídrico (Greenspan et al.,1996), que levam a perda de peso, pela ocorrência de efluxo demasiado; ou por evitar condições de excesso hídrico, tanto no solo quanto na superfície da baga, que causam rachadura nas bagas por absorção de água demasiada (Greenspan et al.,1996; Clarke et al., 2010; Becker e Knoche 2012a, 2012b).

Em Niagara Rosada, o influxo e o efluxo de água via xilema cessaram no início do amadurecimento, coincidindo com o aumento expressivo na taxa de perda de vitalidade celular, fortalecendo a hipótese de isolamento xilemático entre a baga e a planta-mãe para essa variedade. Dessa forma, a perda de integridade das membranas celulares pode explicar a diminuição da movimentação de água tanto para dentro quanto para fora da baga, uma vez que essa condição pode inibir a formação de um gradiente de pressão negativa que é necessário para a água se movimentar do pedicelo (planta-mãe) para dentro da baga, através dos vasos xilemáticos e essa situação pode garantir a manutenção das características físicas e químicas até depois do seu amadurecimento.

Essas alterações têm sido estudadas em variedades *Vitis vinífera* como Syrah, Chardonnay e Thompson seedless (Greenspan et al.,1996; Rogiers et al.,

2001; Tyerman et al., 2004; Bondada et al., 2005; Tilbrook e Tyerman, 2008, 2009; Choat, et al., 2009; Bonada et al., 2013). Entretanto, a mudança na funcionalidade do xilema, assim como o aumento na taxa de perda de vitalidade celular foram registrados, prioritariamente, em pós-*veraison* para Chardonnay e Syrah, sendo que a última continuou apresentando efluxo.

A variedade Thompson seedless mantém suas características fisiológicas com alta condutância hidráulica, mas sem efluxo e tendo, ainda, alta taxa de vitalidade celular até o final do amadurecimento (Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008, 2009; Fuentes et al., 2010), porém tais particularidades podem aumentar a suscetibilidade desta variedade a rachaduras (Dean et al., 2015). Diferentemente ocorre com as bagas de Niagara Rosada, na qual influxo e efluxo através do xilema param, o que pode dificultar a ocorrência de rachadura, assim como a perda demasiada de água, além de exibir mais de 80% de perda de vitalidade celular em bagas pós-*veraison* (85 DAA).

No entanto, mesmo com a intensificação da taxa de perda de integridade das membranas celulares, diminuição do transporte de água via xilema e aumento na deformabilidade das bagas acontecendo no início do amadurecimento, a Niagara Rosada mostrou a manutenção da vitalidade celular na região dos vasos condutores centrais das bagas (*brush*), visto pela contínua fluorescência do corante FDA nessa região, até o final do amadurecimento das bagas (Figura 14).

Resultado semelhante foi encontrado por Fuentes et al. (2010) para a variedade Chardonnay. Essa manutenção de vitalidade pode significar que, a regulação no transporte de água e soluto entre a baga e a planta-mãe ainda pode ser mantida (Tilbrook e Tyerman, 2008), muito provavelmente a partir da movimentação da água via floema (Fuentes et al., 2010), já que nos vasos xilemáticos da região do *brush*, a resistência hidráulica torna-se maior ao longo do amadurecimento (Tyerman et al., 2004).

O progresso da perda de vitalidade celular pode ser mais uma resposta à idade cronológica das bagas do que a outras variáveis de amadurecimento (Krasnow et al., 2008), uma vez que o padrão de perda de vitalidade celular após o *veraison* encontrado para Syrah e Chardonnay foi similar para cada uma, independente do ano de produção ou das videiras estarem a campo ou em casa de vegetação e não variou em resposta à diferença dos sólidos solúveis totais em cada condição de produção.

Nossos resultados sugerem que para Niagara Rosada, a perda de vitalidade das células do mesocarpo tem grande influência na mudança de movimentação de água através do xilema para dentro e para fora da baga e na manutenção dos atributos físicos e químicos até após o seu amadurecimento.

A morte celular é um evento comum da parte final do ciclo de desenvolvimento para órgãos e tecidos vegetais (Greenberg 1996; Thomas et al., 2009) e para bagas de uva, a intensidade e o período em que ocorre, dentro do ciclo de desenvolvimento, parece ser determinado especificamente pela variedade e isso interfere diretamente na qualidade final do fruto.

Portanto, compreender como e porque tais mudanças que levam à perda de integridade celular ocorrem (como mudança na composição da membrana e a ação de enzimas que pode levar a deterioração da membrana celular), além de comprovar, por métodos diretos a existência de um equilíbrio de pressão hidrostática no apoplasto das bagas de Niagara Rosada a partir do *veraison*, podem constituir passos importantes para prolongar as características físicas e químicas desejáveis, sejam elas para o consumo *in natura*, produção de suco ou para elaboração de vinho.

O isolamento do xilema, a partir do início do amadurecimento, evidencia a importância do fornecimento de água via floema para as bagas. A terceira fase de desenvolvimento é dependente do influxo de água via floema, quando o crescimento das bagas é retomado juntamente como o desenvolvimento de outras características químicas.

O aumento do influxo de água via floema para dentro da baga, no início do amadurecimento, é suficiente para reverter a murcha de bagas induzida por estresse hídrico (Keller et al., 2015). Portanto, está claro que o floema tem importante contribuição para o amadurecimento das bagas após as mudanças que ocorrem na funcionalidade do xilema e integridade celular, porém, a real participação do floema no desenvolvimento das bagas de uva, ainda não é bem compreendida e deve ser o foco de pesquisas posteriores, que expliquem fisiologicamente o seu papel no desenvolvimento das bagas de uva.

8. CONCLUSÃO

Os resultados das análises de vitalidade celular do mesocarpo e funcionalidade do xilema comprovaram que a diminuição do fluxo de água via xilema está associada ao aumento na taxa de perda de vitalidade celular durante o desenvolvimento das bagas. Tanto influxo quanto efluxo de água, via xilema, cessaram no início do amadurecimento, no mesmo período em que a taxa de perda de vitalidade celular no mesocarpo foi intensificada. As mudanças fisiológicas avaliadas aconteceram no início do amadurecimento para a variedade Niagara Rosada, levando as bagas a um isolamento hidráulico nos vasos xilemáticos. A paralisação do fluxo de água via xilema, durante o amadurecimento, favoreceu a manutenção de características físicas, como a conservação do tamanho da baga, mesmo quando essas atingiram elevada taxa de perda de vitalidade celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antolin, M.C., Santesteban, H., Santa Maria, E., Aguirreolea, J., Sanchez-Diaz, M. (2008) Involvement of the abscisic acid and polyamines in berry ripening of *Vitis vinifera* (L.) subjected to water deficit irrigation. *Australian journal of the grape and wine Research*, 14:123-133.
- Bapat, V.A., Trivedi, P.K., Ghosh, A., Sane, V.A., Ganapathi, T.R., Nath P. (2010) Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol Advances*, 28(1):94-107.
- Becker, T., Knoche, M. (2012a) Deposition, strain, and microcracking of the cuticle in developing 'Riesling' grape berries. *Vitis*, 51(1):1-6.
- Becker, T., Knoche, M. (2012b) Water induces microcracks in the grape berry cuticle. *Vitis*, 51(3):141-142.
- Bonada, M., Sadras, V.O., Fuentes, S. (2013) Effect of elevated temperature on the onset and rate of mesocarp cell death in berries of Shiraz and Chardonnay and its relationship with berry shrivel. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(1):87-94.
- Bondada, B.R., Matthews, M.A., Shackel, K.A. (2005) Functional xylem in the post-veraison grape berry. *Journal of Experimental Botany*, 56:2949-2957.
- Böttcher, C., Keyzers, R.A., Boss, P.K., Davies, C. (2010) Sequestration of auxin by the indole-3acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *Journal of Experimental Botany*, 61:3615-3625.

- Bruce, D.M. (2003) Mathematical modelling of the cellular mechanics of plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358 (1437):1437-1444.
- Brüggenwirth, M., Knoche, M. (2015) Xylem conductance of sweet cherry pedicels. *Trees*, 29(6):1851-1860.
- Camargo, U.A. (1998) *Cultivares para a viticultura tropical*. Informe Agropecuario, 19 (194): 15-19.
- Candolfifi-Vasconcelos, M.C., Candolfifi, M.P., Koblet, W. (1994) Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L. *Planta*, 192: 567-573.
- Castellarin, S.D., Gambetta, G.A., Wada, H., Shackel, K.A., Matthews, M.A. (2011) Fruit ripening in *Vitis vinifera*: spatiotemporal relationships among turgor, sugar accumulation, and anthocyanin biosynthesis. *Journal of experimental botany*, 62:4345–4354.
- Chatelet, D.S., Rost, T.L., Shackel, K.A., Matthews, M.A. (2008). The peripheral xylem of grapevine (*Vitis vinifera*). 1. Structural integrity in post-veraison berries. *Journal of experimental botany*, 59(8):1987-1996.
- Chaves, A.L.S., Mello-Farias, P.C. (2006) Ethylene and fruit ripening: from illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 508-515.
- Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., Teissedre, P.L. (2009) Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:545-553.
- Choat, B., Gambetta, G.A., Shackel, K.A., Matthews, M.A. (2009) Vascular function in grape berries across development and its relevance to apparent hydraulic isolation. *Plant Physiology*, 151:1677-1687.
- Clarke, S.J., Hardie, W.J., Rogiers, S.Y. (2010) Changes in susceptibility of grape berries to splitting are related to impaired osmotic water uptake associated with losses in cell vitality. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(3):469-476.
- Clearwater, M.J., Luo, Z., Chye Ong, S.E., Blattmann, P., Thorp, T.G. (2012) Vascular functioning and the water balance of ripening kiwifruit (*Actinidia chinensis*) berries. *Journal Experimental Botany*, 63:1835–1847.
- Coombe, B.G. (1976) The development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology*, 27:20-228.
- Coombe, B.G. (1992) Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43:10-110.

- Coombe, B.G. (1995) Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of grape and Wine Research*, 1:104-110.
- Coombe, B.G., Bishop, G.R. (1980) Development of the grape berry. II. Changes in diameter and deformability during veraison. *Australian Journal of grape and Wine Research*, 31:499-509.
- Coombe, B.G., Hale, C.R. (1973) The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatment. *Plant Physiology*, 51: 629-634.
- Coombe, B.G., Iland, P.G. (2004) Grape berry development and winegrape quality. In: *Viticulture Volume 1 Resources*, 2nd Edition. P. R. Dry and B. G. Coombe (Eds). (Winetitles: Adelaide), p. 210-248.
- Coombe, B.G., McCarthy, M.G. (2000) Dynamics of berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6:131-135.
- Creasy, G.L., Price, S.F., Lombard, P.B. (1993) Evidence for xylem discontinuity in Pinot Noir and Merlot: dye uptake and mineral composition during berry maturation. *American Journal of Enology and Viticulture*,44:187-192.
- Dean, R.J., Bobek, G., Stait-Gardner, T., Clarke, S.J., Rogiers, S.Y., Price, W.S. (2015) Time-course study of grape berry split using diffusion magnetic resonance imaging. *Australian Journal of Grape and Wine Research*.
- Dreier, L.P., Hunter, J.J., Ruffner, H.P. (1998) Invertase activity, grape Berry development and cell compartmentation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36:865-872.
- Dreier, L.P., Stoll, G.S., Ruffner, H.P. (2000) Berry ripening and evapotranspiration in *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture*,51:340-346.
- Düring, H., Lang, A., Oggioni, F. (1987) Patterns of water flow in Riesling berries in relation to developmental changes in their xylem morphology. *Vitis*,26:123-131.
- Eichhorn, K.W., Lorenz, D.H. (1977) Phänologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd*, 29:119-120.
- Findlay, N., Oliver, K.J., Nii, N., Coombe, B.G. (1987) Solute accumulation by grape pericarp cells. IV. Perfusion of pericarp apoplast via the pedicel and evidence for xylem malfunction in ripening berries. *Journal Experimental Botany*,38:668-679.
- Fuentes, S., Sullivan, W., Tilbrook, J., Tyerman, S.D. (2010) A novel analysis of grapevine berry tissue demonstrates a variety-dependent correlation between tissue vitality and berry shrivel. *Australian Journal of Grape and Wine Research*,16:327-336.

- Galet, P. (1983) *Precis de viticulture*. 4 ed. Montpellier: Déhan, 584p.
- Giovannini, E. (1999) *Produção de uvas para vinho, suco e mesa*. Porto Alegre: Renascença, 364p.
- Greenberg, J.T. (1996) *Programmed cell death: a way of life for plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93:12094-12097.
- Greenspan, M.D., Shackel, K.A., Matthews, M.A. (1994) Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. *Plant, Cell and Environment*, 17:811-820.
- Greenspan, M.D., Schultz, H.R., Matthews, M.A. (1996) Field evaluation of water transport in grape berries during water deficit. *Physiologia Plantarum*, 97:55-62.
- Greer, D.H., Rogiers, S.Y. (2009) Water flux of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz bunches throughout development and in relation to late-season weight loss. *American journal of enology and viticulture*, 60(2):155-163.
- Greer, D.H., Weedon, M.M. (2013). The impact of high temperatures on *Vitis vinifera* cv. Semillon grapevine performance and berry ripening. *Frontiers in plant science*, 4:491.
- Greer, D.H., Weston, C. (2010) Heat stress affects flowering, berry growth, sugar accumulation and photosynthesis of *Vitis vinifera* cv. Semillon grapevines grown in a controlled environment. *Functional Plant Biology*, 37(3):206-214.
- Hardie, W.J. (2000) Grapevine biology and adaption to viticulture. *Australian Journal of Grape and wine Research*, 6:74-81.
- Hidalgo, L. (2002) *Tratado de viticultura general*. 3 ed. Madri: Mundi-prensa, 1235p.
- Hrazdina, G., Parsons, G.F., Mattick, L.R. (1984) Physiological and biochemical events during development and ripening of grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35:220-227.
- Iland, P., Dry, P., Proffitt, T., Tyerman, S. (2011) *The grapevine: from the science to the practice of growing wines for wine*. 1^a ed. Adelaide: Patrick Iland Wine Promotions. 310p.
- Jackson, R.S. (2008). *Wine science: principles and applications*. 3^a ed. Califórnia: Academic press. 751p.
- Jones, K.H., Senft, J.A. (1985) An improved method to determine cellviability by simultaneous staining with fluorescein diacetate–propidium iodide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33:77-79.

- Keller, M., Smith, J.P., Bondada, B.R. (2006) Ripening grape berries remain hydraulically connected to the shoot. *Journal of Experimental Botany*, 57: 2577-2587.
- Keller, M., Zhang, Y., Shrestha, P.M., Biondi, M., Bondada, B.R. (2015) Sugar demand of ripening grape berries leads to recycling of surplus phloem water via the xylem. *Plant, cell & environment*, 38(6):1048-1059.
- Knoche, M., Grimm, E., Schlegel, H.J.(2014) Mature sweet cherries have low turgor. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139:3-12.
- Krasnow, M., Matthews, M.A., Shackel, K.A. (2008) Evidence for substantial maintenance of membrane integrity and cell viability in normally developing grape (*Vitis vinifera* L.) berries throughout development. *Journal of Experimental Botany*,59:849-859.
- Lang, A. Düring, H. (1991) Partitioning control by water potential gradient: Evidence for compartmentation breakdown in grape berries. *Journal of Experimental Botany*, 42:1117-1122.
- Lang, A., Thorpe, M.R. (1989) Xylem, phloem and transpiration flows in a grape: application of a technique for measuring the volume of attached fruits to high resolution using Archimedes' principle. *Journal of Experimental Botany*, 40: 1069-1078.
- Lang, G.A., Early, J.D., Martin, G.C., Darnell, R.L. (1987) Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hort Science*, 22 (3):371-377.
- Leão, P.C.D.S., Da Silva, E.E.G. (2003). Caracterização fenológica e requerimentos térmicos de variedades de uvas sem sementes no vale do são francisco1. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25 (3):379-382.
- Lecas, M., Brillouet, J.M. (1994) Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry*, 35(5):1241-1243.
- Martin, D.M., Toub, O., Chiang, A., Lo, B.C., Ohse, S., Lund, S.T.; Bohlmann, J. (2009) The bouquet of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) flowers arises from the biosynthesis of sesquiterpene volatiles in pollen grains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17):7245-7250.
- Martin, J.T. (1964) Role of cuticle in the defense against plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 2(1):81-100.
- Matile, P. (1978) Biochemistry and functions of vacuoles. *Annual Review of Phytopathology*, 29:193-213.

- Matthews, M.A., Thomas, T.R., Shackel, K.A. (2009) Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: possible relation of veraison to turgor and Berry softening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*,15:278-283.
- McCarthy, M.G. (1999) Weight loss from ripening berries of Shiraz grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz). *Australian Journal of Grape and Wine Research*,5:10-16.
- McCarthy, M.G., Coombe, B.G. (1999) Is weight loss in ripening grape berries cv. Shiraz caused by impeded phloem transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research*,5:17-21.
- McGuire, R.G. (1992) Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12):1254-1255.
- Mignani, I., Greve, L.C., Benarie, R., Stotz, H.U., Li, C., Shackel, K.A., Labavitch, J.M. (1995) The effects of GA3 and divalent-cations on aspects of pectin metabolism and tissue softening in ripening tomato pericarp. *Physiologia Plantarum* 93:108-115.
- Miolo, A., Miele, A. (2003) *O sabor do vinho*. Bento Gonçalves: Vinícola: Embrapa Uva e Vinho, 133p.
- Morrison, J.C. (1991) Bud development in *Vitis vinifera* L. *Botanical Gazette*, 152(3):304-315.
- Mpelasoka, B.S., Schachtman, D.P., Treeby, M.T., Thomas, M.R. (2003) A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation. *Australian Journal of grape and wine research*, 9(3):154-168.
- Mullins, M.G., Bouquet, A., Willians, L.E. (1992) *Biology of horticultural crops: Biology of the grapevine*. Ed. Cambridge University Press, p. 239.
- Oberle, G.D. (1938) A genetic study of variations in floral morphology and functions incultivated forms of *Vitis*. *New York, N.Y. State Agriculture Experimental Station*, 250, p.63.
- Ollat, N., Gaudillère, J.P. (1996) Investigation of assimilate import mechanisms in berries of *Vitis vinifera* var. 'Cabernet Sauvignon'. *Acta Horticulturae*, 427:141-149.
- Perez peña, J.E. (2004) *Whole-canopy photosynthesis and transpiration under regulated deficit irrigation in Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon*. PhD Thesis, Washington State University. 234p.
- Petri, J.L.; palladini, L.A.; Pola, A.C. (2006) Dormência e indução a brotação em macieira. In: EPAGRI. *A cultura da macieira*, p. 261-297.
- Pommer, C.V. (2003) *Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 778 p.

- Pratt, C. (1971) Reproductive anatomy in cultivated grapes: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 22:92-109.
- Reynolds, A.G., Pool, R.M., Matpick, L. (1986) Influence of cluster exposure on fruit composition and wine quality of Seyval blanc grape. *Vitis*, 25:85-95.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2003). *Tratado de enología: 1. Microbiología Del vino vinificaciones*. Hemisferio Sur, 665p.
- Rogiers, S.Y., Greer, D.H., Hatfield, J.M., Orchard, B.A., Keller, M. (2006) Mineral sinks within ripening berries (*Vitis vinifera* L.). *Vitis-geilweilerhof*, 45:115-123.
- Rogiers, S.Y., Hatfield, J., Gunta Jaudzems, V., White, R., Keller, M. (2004) Grape berry cv. Shiraz epicuticular wax and transpiration during ripening and preharvest weight loss. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55:121-127.
- Rogiers, S.Y., Keller, M., Holzapfel, B.P., Virgona, J.M. (2000) Accumulation of potassium and calcium by ripening berries on field vines of *Vitis vinifera* (L) cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6 (3):240-243.
- Rogiers, S.Y., Smith, J.S., White, R., Keller, M., Holzapfel, B.P., Virgona J.M. (2001) Vascular function in berries of *Vitis vinifera* (L) cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7:47-51.
- Sadras, V., McCarthy, M.G. (2007) Quantifying the dynamics of sugar concentration in berries of '*Vitis vinifera*' cv. Shiraz: a novel approach based on allometric analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13:66-71.
- Saure, M.C. (2005) Calcium Translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. *Scientia Horticulturae*, 105:65-89.
- Schumann, C., Schlegel, H.J., Grimm, E., Knoche, M., Lang, A. (2014) Water potential and its components in developing sweet cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139: 349– 355.
- Symons, G.M., Davies, C., Shavrukov, Y., Dry, I.B., Reid, J.B., Thomas, M.R. (2006) Grape on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology*, 140:150-158.
- Talbot, P.W. (1955) Detection of vascular tissues available for water transport in the hop by colorless derivatives of basic dyes. *Nature*, 175: 510.
- Thomas, H., Huang, L., Young, M., Ougham, H. (2009) Evolution of plant senescence. *BMC Evolutionary Biology*, 9:163.

- Thomas, T.R., Matthews, M.A., Shackel, K.A. (2006) Direct *in situ* measurement of cell turgor in grape (*Vitis vinifera* L.) berries during development and in response to plant water deficits. *Plant, Cell and Environment*, 29:993-1001.
- Thomas, T.R., Shackel, K.A., Matthews, M.A. (2008) Mesocarp cell turgor in *Vitis vinifera* L. berries throughout development and its relation to firmness, growth, and the onset of ripening. *Planta*, 228:1067-1076.
- Tilbrook, J., Tyerman, S.D. (2006) Water, sugar and acid: how and where they come and go during berry ripening. In: Proceedings of seminar 'Finishing the job – optimal ripening of Cabernet Sauvignon and Shiraz'. D. Oag, K. DeGaris, S. Partridge, C. Dundon, M. Francis, R. Johnstone, R. Hamilton (Eds). (Australian Society of viticulture and Oenology: Adelaide), pp. 4-10.
- Tilbrook, J., Tyerman, S.D. (2008) Cell death in grape berries: varietal differences linked to xylem pressure and berry weight loss. *Functional Plant Biology*, 35:173-184.
- Tilbrook, J., Tyerman, S.D. (2009) Hydraulic connection of grape berries to the vine: varietal differences in water conductance into and out of berries, and potential for backflow. *Functional Plant Biology*, 36 (6):541-550.
- Tong, C., Krueger, D., Vickers, Z., Bedford, D., Luby, J., El-Shiekh, A., Shackel, K., Ahmadi, H. (1999) Comparison of softening-related changes during storage of 'Honeycrisp' apple, its parents, and 'Delicious'. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124:407-415.
- Tyerman, S.D., Tilbrook, J., Pardo, C., Kotula, L., Sullivan, W., Steudle, E. (2004) Direct measurement of hydraulic properties in developing berries of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz and Chardonnay. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10:170-181.
- Tyree, M.T., Sperry, J.S. (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual review of plant biology*, 40(1):19-36.
- Wada, H., Shackel, K.A., Matthews, M.A. (2008) Fruit ripening in *Vitis vinifera*: apoplastic solute accumulation accounts for pre-veraison turgor loss in berries. *Planta*, 227:1351-1361.
- Zhang, X.Y., Wang, X.L., Wang, X.F., Xia, G.H., Pan, Q.H., Fan, R.C., Wu, F.Q., Yu, X.C., Zhang, D.P. (2006). A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiology*, 142:220-232.
- Zhaosen, X., Forney, C.F., Hongmei, C., Li, B. (2014) Changes in water translocation in the vascular tissue of grape during fruit development. *Pakistan Journal of Botany*, 46(2):483-488.