

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

AVANÇOS NO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE MUDAS DE VIDEIRA PELA
ENXERTIA DE MESA NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Daniel Santos Grohs
Engenheiro Agrônomo/UFRGS
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada com um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Sistemas de Produção Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Outubro de 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Grohs, Daniel Santos
AVANÇOS NO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE MUDAS DE VIDEIRA
PELA ENXERTIA DE MESA NA REGIÃO SUL DO BRASIL / Daniel
Santos Grohs. -- 2020.
190 f.
Orientador: Paulo Vitor Dutra de Souza.

Coorientador: Henrique Pessoa dos Santos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2020.

1. Vitis spp.. 2. calogênese. 3. enxertia. 4.
viveiros. 5. mudas. I. de Souza, Paulo Vitor Dutra,
orient. II. dos Santos, Henrique Pessoa, coorient.
III. Título.

DANIEL SANTOS GROHS
Engenheiro Agrônomo - UFRGS
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 20.10.2020
Pela Banca Examinadora
(Via videoconferência)

Homologado em: 11.11.2020
Por

PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA
Orientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

HENRIQUE PESSOA DOS SANTOS
Coorientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
PPG Fitotecnia/UFRGS

LUIS ANTÔNIO BIASI
PPG AGRONOMIA/UFPR

ANDRÉ LUIZ KULKAMP DE SOUZA
EPAGRI
Santa Catarina

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui meu sincero agradecimento:

Àquelas pessoas especiais que assumiram compromisso pessoal e permitiram a concepção desta iniciativa em 2016.

À minha família por saber que sempre estavam presentes e poderia contar quando precisasse. E, em especial, à Amanda, esposa e amiga, que esteve ao meu lado durante esta trajetória no incentivo ao trabalho, apoio científico e ombro nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, pela oportunidade de realizar um desejo acadêmico de longa data e permitir a liberdade na escolha do tema e condução dos trabalhos.

Ao meu coorientador, por sua presença vital na operacionalização dos trabalhos de campo e laboratório, além de disponibilizar do seu tempo para compartilhar os conhecimentos que me levaram aos questionamentos necessários na construção da tese.

À equipe de apoio da Embrapa Uva e Vinho dos setores de Casas de Vegetação e Campos Experimentais que viabilizaram o operacional deste trabalho. Destaco a participação dos colegas Heitor Corbelini e Alessandra Russi que de modo responsável estiveram à frente das demandas trazidas.

Aos estagiários e bolsistas que, ao longo destes anos, se apresentaram na contribuição prática em avaliações e coletas, mas em especial, o bolsista Mikael Benati.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa por sua contribuição e parceria nas discussões.

A todos viveiristas de videira que, através de suas demandas, motivaram o tema desta tese e a quem dedico o trabalho.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade”

Albert Einstein

AVANÇOS NO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE MUDAS DE VIDEIRA PELA ENXERTIA DE MESA NA REGIÃO SUL DO BRASIL¹

Autor: Daniel Santos Grohs

Orientador: Paulo Vitor Dutra de Souza

Coorientador: Henrique Pessoa dos Santos

RESUMO

No Sul do Brasil, o setor viveirista demanda avanços técnicos para garantia de qualidade de mudas de videiras. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar ajustes fitotécnicos para obtenção de mudas de videiras com elevada capacidade de formação de calos, de brotação e de enraizamento. O trabalho foi realizado em Bento Gonçalves-RS, de 2017 a 2019, e correspondeu a experimentos conduzidos na etapa de pré-enxertia (capítulos 1 e 2) e de forçagem (capítulo 3). No capítulo 1, foi avaliada qualidade de mudas de 'Bordô' (B), 'Riesling Itálico' (R) e 'BRS Violeta' (V), enxertadas em 'Paulsen1103' (P), produzidas a partir de estacas coletadas em junho, julho e agosto e submetidas a frio artificial (60, 30 e 0 dias, respectivamente). A coleta antecipada de estacas em matrizes de B/P foi avaliada em 2018 e 2019 pela aplicação de etefon em abril, visando desfolha. No capítulo 2, foi realizada caracterização do perfil fitohormonal de mudas de B/P e de V/P. Nove fitohormônios foram quantificados em tecidos lignificados por cromatografia associada à espectrometria de massa (LC-MS/MS). Para B/P, a caracterização do perfil fitohormonal também considerou exposição das estacas ao frio artificial e aplicação de etefon. No capítulo 3, para prospecção e validação de formulações indutoras de calogênese, calos *in vitro* de R foram co-cultivados com 'SO4', 'Paulsen1103' e 'VR043-43' em meios de cultura com formulações de auxinas, citocininas, fenóis e antioxidantes, sendo aquelas que mais induziram co-cultivo validadas *in vivo* em mudas de B e R nos porta-enxertos citados. Os resultados indicaram que estacas coletadas até final de julho e com exposição a frio artificial por pelo menos 30 dias garantiram qualidade das mudas nos anos e combinações enxerto/porta-enxerto avaliados. Antecipação da coleta por desfolha decorrente da aplicação de etefon não causa danos à qualidade, desde que as estacas permaneçam 90 dias em frio artificial. No perfil fitohormonal destacam-se ácidos abscísico, salicílico e giberélico como os de maior associação a mudas de maior qualidade. Na forçagem, aplicação de formulação à base de ácido indolbutírico (2,5 mg l⁻¹) mais 6-benzilaminopurina (1,0 mg l⁻¹) mostra-se promissora na formação de calos, mas o efeito depende da combinação enxerto/porta-enxerto.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (190f.) Outubro, 2020.

ADVANCES IN MECHANIZED BENCH GRAFTING SYSTEM IN SOUTHERN BRAZIL

Author: Daniel Santos Grohs

Adviser: Paulo Vitor Dutra de Souza

Co-adviser: Henrique Pessoa dos Santos

ABSTRACT

In southern Brazil, nurseries demand advances in grafting techniques to produce high quality grapevine grafted plants. This work aims at developing and validating agricultural management practices to produce grapevine grafted plants with high capacity to former callus, shoots and roots. The study was conducted in Bento Gonçalves-RS, from 2017 to 2019 and corresponded on experiments carried out in the stage of pre-grafting (chapters 1 and 2) and forcing (chapter 3). In chapter 1, the quality of Bordô (B), Riesling Itálico (R) and BRS Violeta (V) scions on Paulsen1103 (P) rootstock was analyzed according to cuttings collected month (June, July and August) and cold storage (60, 30 and 0 days, respectively). In B/P mother plants early collection of cuttings was evaluated in 2018 and 2019 by the application of ethephon (to induce leaf loss) in April. In chapter 2, the phytohormonal profile of B/P and V/P was characterized. Nine phytohormones were quantified in lignified tissues by chromatography associated with mass spectrometry (LC-MS/MS). The phytohormonal profile of B/P was also performed considering the time of cold storage and ethephon application. In chapter 3, for prospecting and validation of graft union formulations, *in vitro* R callus were co-cultivated with SO4, Paulsen1103 and VR043-43 in culture medium containing auxin, cytokinin, phenol and antioxidants. The formulations that most induced *in vitro* callogenesis were *in vivo* validated (B and R scions on SO4, Paulsen1103 and VR043-43 rootstocks). The results indicated that cuttings collected until the end of July and with exposure to cold storage for at least 30 days ensured quality of the grafted plants in years and scions/rootstock evaluated. Early collection resulting from ethephon application not reduce grapevine grafted plants quality, provided that the cuttings keep in cold storage for 90 days. In the phytohormonal profile, the acids abscisic, salicylic and gibberellic highlighted as those most associated with higher quality grafted plants. In the forcing, the indolebutyric acid (2.50 mg l⁻¹) plus 6-benzylaminopurine (1.00 mg l⁻¹) is promising for graft callus union, but the effect depends on the scion/rootstock combination.

² Doctoral Thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (190p.) October, 2020.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 A produção de mudas na viticultura no Sul do Brasil	7
2.2 Aspectos fisiológicos na formação de mudas	10
2.3 Enxertia de mesa e os fatores que afetam a formação da muda	13
2.4 Estratégias para o aumento da qualidade de mudas	31
2.5 Indicadores de formação e qualidade de mudas.....	38
2.6 Referências bibliográficas	45
3 CAPÍTULO 1 - Épocas de coleta de material vegetal e tempos de armazenagem em câmara frigorífica para obtenção de mudas com elevada qualidade fitotécnica em diferentes cultivares de videiras no Sul do Brasil.....	57
3.1 Introdução	57
3.2 Material e Métodos.....	59
3.3 Resultados	68
3.4 Discussão.....	87
3.5 Conclusões	100
3.6 Referências bibliográficas	101
4 CAPÍTULO 2 - Caracterização das qualidades fitotécnica e fitohormonal em mudas de videira sob diferentes condições de manejo	106
4.1 Introdução	106
4.2 Material e Métodos.....	107
4.3 Resultados	114
4.4 Discussão.....	127

	Página
4.5 Conclusões	137
4.6 Referências bibliográficas	137
5 CAPITULO 3 - Prospecção de formulações com reguladores de crescimento a partir do co-cultivo de calos in vitro para indução da enxertia in vivo em videiras.....	141
5.1 Introdução	141
5.2 Material e Métodos.....	144
5.3 Resultados	149
5.4 Discussão.....	163
5.5 Conclusões	169
5.6 Referências bibliográficas	170
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	175

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

CAPITULO 2

1. Peso acumulado na PCA e concentração (ng g⁻¹) (na média das três porções) dos fitohormônios (AIA, EPI, Z, t-ZR, GA₃, GA₄, AJ, ABA, AS (HORM.) nos seguintes experimentos: cultivares ('Riesling', 'Bordô' e 'Violeta' sobre 'Paulsen1103') (1); épocas de coleta (jul e ago) com e sem armazenagem em câmara frigorífica (60 dias); (2) épocas de coleta (mai e jul) com e sem uso de etefon (aplicado em abril) (3) 121
2. Correlograma resultante da associação entre seis variáveis fitotécnicas: estágio de brotos (B_E), diâmetro do calo (C_D), taxa de formação do calo (C_S) e percentual de plantas com: brotação (B_%), calos (C_%), raízes (R_%), e) mais o escore de qualidade das mudas (escore) com nove fitohormônios (concentração média entre as três porções): AIA, EPI, Z, t-ZR, GA₃, GA₄, AJ, ABA e AS; concentração média dos fitohormônios (MEDIA); 'peso acumulado' médio (PESO) e frequência de valores positivos do 'peso acumulado' (FREQ.) no total de 11 observações obtidas dos experimentos 1,2 e 3 (detalhados na Tab. 1). 122
3. Correlograma resultante da associação entre seis variáveis fitotécnicas: estágio de brotos (B_E), diâmetro do calo (C_D), taxa de formação do calo (C_S) e percentual de plantas com: brotação (B_%), calos (C_%), raízes (R_%), e) mais o escore de qualidade das mudas (escore) com nove fitohormônios (em três porções da muda: enxerto, corte da enxertia e porta-enxerto): AIA, EPI, Z, t-ZR, GA₃, GA₄, AJ, ABA e AS no total de 11 observações obtidas dos exp. 1,2 e 3 (detalhados na Tabela 1) 123

CAPITULO 3

1. Variáveis da qualidade de mudas, obtidas nas seis combinações dos enxertos 'Riesling Itálico' e 'Bordô' sobre os porta-enxertos, 'P1103', 'SO4' e 'VR043-43', tratados com as formulações de reguladores de crescimento (doses em mg l⁻¹) (TRAT.) (descrição das siglas na legenda da Fig.1): BAP(1,00), AIA(2,50)+BAP(1,00), DBA(1,75)+BAP(1,00), PADRÃO (cera com DBA) e CONTROLE (sem aplicação de formulação)..... 161

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

CAPITULO 1

1. Aspectos gerais da metodologia empregada para produção de mudas *in vivo*: feixes de material vegetal na câmara frigorífica (A); detalhe do feixe (B) e aspecto interno dos sarmentos três meses após armazenagem (C); detalhe de enxertia do tipo ômega (D); mudas em pré-forçagem (E); mudas pós-aclimatação (F); detalhes de muda pós-aclimatação (G); exemplos de classes de calogênese de enxertia (H): completa (H1), parcial (H2) e incompleta (H3)..... 63
2. Aspecto geral das plantas na área de manejo do etefon, antes da 1ª aplicação (06/04/2018): 'Bordô' (A1) e 'P1103' (A2). 20 dias após a 1ª aplicação (28/04/2018): ('Bordô' (B1) e 'P1103' (B2)) e o controle ('Bordô' (C1) e 'P1103' (C2)). Detalhe de ramos de 'Bordô' em 2018, após a 1ª aplicação (D2) e o controle (D1). 20 dias após a 2ª aplicação em 2018 (20/05): 'Bordô' (E1) e 'P1103' (E2). 20 dias após a aplicação singular em 2019 (16/04): 'Bordô' (F1) e 'P1103' (F2)..... 67
3. Precipitação pluvial (A) e temperaturas do ar máximas, médias e mínimas (B) no período de dezembro a março de 2017, 2018 e 2019 e na normal climatológica padrão 1981-2010 de Bento Gonçalves, RS. Estação meteorológica Embrapa Uva e Vinho 78
4. Precipitação pluvial (A) e temperaturas do ar máximas, médias e mínimas (B) no período de abril a agosto de 2017, 2018 e 2019 e na normal climatológica padrão 1981-2010 de Bento Gonçalves, RS. Estação meteorológica Embrapa Uva e Vinho 79
5. Acúmulo de horas de frio (abaixo de 7,2°C) mensal e total, no período de abril a agosto de 2017, 2018 e 2019 (A) Acúmulo de horas de frio de abril até a data de cada coleta (B). *Câmara: são as HF acumuladas da coleta até a enxertia em final de agosto: JUN (30d), JUL (60d) e AGO (0)..... 80

6. Gráfico de escore resultante da PCA formada pelos fatores: anos (2017-17; 2018-18; 2019-19); cultivares (Bordô-B, Riesling Itálico-R, BRS Violeta-V) e épocas de coleta (final de jun-E1, final de jul-E2, final de ago-E3) (A). Gráfico de peso obtido a partir das variáveis: estágio do broto (brotação_est), diâmetro do calo (calo_diam), taxa de formação do calo (calo_sold) e percentual de plantas com: raízes (raiz_%), brotação (brotação_%) e calos (calo_%) (B). Gráfico de caixas formado pelas observações nos anos de 2017, 2018 e 2019 (C). *Na Fig.A, barras múltiplas de desvio padrão não sobrepostas indicam a discriminação amostral entre anos*..... 81
7. Gráficos de escores resultante da PCA formada pelos fatores cultivares (Bordô-B, Riesling Itálico-R, BRS Violeta-V) e épocas de coleta (final de jun-E1, final de jul-E2, final de ago-E3) nos anos: 2017 (A1 e A2), 2018 (B1 e B2) e 2019 (C1 e C2). Gráficos de pesos obtidos a partir das variáveis: estágio do broto (1), diâmetro do calo (2), taxa de formação do calo (3) e percentual de plantas com: brotação (4) e calos (5) e raízes (6). *Barras múltiplas de desvio padrão não sobrepostas indicam discriminação amostral entre cultivares (A1,B1,C1) e épocas (A2,B2,C2)*..... 82
8. Gráficos de caixas formados pelas observações obtidas nas cultivares Bordô (B), Riesling (R) e Violeta (V) (A) e nas épocas de final de jun (E1), final de jul (E2) e final de ago (E3) (B) em três anos. Gráfico de barras de erro padrão com ajuste das linhas de interação do escore entre épocas para três cultivares (C)..... 83
9. Gráfico de barras formado pelos tratamentos aplicados na combinação 'Bordô'/P1103', nos anos 2018 e 2019: épocas de coleta fixas e tempos de armazenagem variáveis (A1); épocas de coleta variáveis e de enxertia fixas (A2); épocas de coleta e de enxertia variáveis e tempos de armazenagem fixos, em 2018 (B1) e 2019 (B2); épocas de coleta e tempos de armazenagem variáveis e épocas de enxertia fixas (C). *, ** e *ns*: *significativo à 5%, 1% e não-significativo, respectivamente. ¹Mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas entre colunas não diferem-se estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis. ²Erro padrão da média* 84
10. Gráfico de barras formado pelos tratamentos aplicados na combinação 'Bordô'/P1103' em 2019: escore de qualidade das mudas (A); percentual de plantas com brotos (B), estágio de brotos (C); percentual de plantas com brotos (D), taxa de formação do calo (E); diâmetro do calo (F) e percentual de plantas com raízes (G). *, ** e *ns*: *significativo a 5%, 1% e não-significativo, respectivamente (f-teste). ²Erro padrão da média*..... 85

11. Gráfico de barras formado pelos tratamentos aplicados na combinação 'Bordô'/P1103', nos anos de 2018 e 2019: escore de qualidade das mudas (A); percentual de plantas com brotos (B), estágio de brotos (C); percentual de plantas com brotos (D), taxa de formação do calo (E); diâmetro do calo (F) e percentual de plantas com raízes (G). *¹Mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas entre colunas não diferem-se estatisticamente pelos teste de Kruskal-Wallis (A,C,F) e Cochran (B,D,G). *,** e ns: significativo a 5%, 1% e não-significativo, respectivamente. ²Erro padrão da média..... 86*

CAPITULO 2

1. Aspectos gerais da metodologia empregada para coleta e obtenção das amostras de tecido vegetal, utilizadas na quantificação do perfil fitohormonal. Raspagem da cera (A). Detalhe do enxerto antes (B1) e depois da raspagem (B2). Corte de segmentos e acondicionamento no pré-processamento (C). Processamento prévio de amostras, empregando nitrogênio líquido, para a moagem antes da extração dos fitohormônios (D). Bento Goçaves, set/2019.. 113
2. Gráficos de escores resultante da PCA formada pelos fatores: cultivar (A); época de coleta (B) e utilização ou não do etefon em abril (C). Os fatores foram associados à variáveis fitohormonais (A.1, B.1, C.1) e fitotécnicas (A.2, B.2, C.2). Em B.1, B2 e B.3 gráficos de pesos obtidos a partir das variáveis: estágio do broto (1), diâmetro do calo (2), taxa de formação do calo (3) e percentual de plantas com: brotação (4) e calos (5) e raízes (6). *Barras múltiplas de desvio padrão não sobrepostas indicam discriminação. 120*
3. Gráficos de regressão ajustados sobre a resposta de diferentes variáveis fitotécnicas em função da: frequência do 'peso acumulado' (A) e da concentração dos fitohormônios: AS(B), ABA(C), GA₄(D), GA₃(E), AIA(F), EPI(G), AJ(H) quantificados em diferentes porções da muda. *,** e ns: significativo à 5%, 1% e não-significativo, respectivamente, pelo f-teste do modelo. *¹Intervalo de confiança da regressão à 95%..... 124*
4. Gráficos de barras para a concentração (ng g⁻¹) de quatro fitohormônios (AIA, EPI, Z, t-ZR) determinados nas seguintes porções da muda: porta-enxerto (PE), corte da enxertia (C) e enxerto (E) para os contrastes: coleta em julho com exposição ao frio artificial (30 dias) em 'Bordô' e 'Violeta'(A); coleta em agosto, sem e com exposição ao frio artificial (60 dias) (B); coleta em maio com exposição ao frio artificial (90 dias) sem e com a utilização do etefon em abril (C). *Letras maiúsculas comparam a mesma porção entre tratamentos e minúsculas diferentes porções no mesmo tratamento pelo teste de Kruskal-Wallis. *,** e ns: significativo a 1%, 5% e não-significativo, respectivamente. ¹Erro padrão da média..... 125*

5. Gráficos de barras para a concentração (ng g^{-1}) de cinco fitohormônios (GA_3 , GA_4 , AJ, ABA, AS) determinados nas seguintes porções da muda: porta-enxerto (PE), corte da enxertia (C) e enxerto (E), para os contrastes: coleta em julho com exposição ao frio artificial (30 dias) em 'Bordô' e 'Violeta' (A); coleta em agosto, sem e com exposição ao frio artificial (60 dias) (B); coleta em maio com exposição ao frio artificial (90 dias) sem e com a utilização do etefon em abril (C). *Letras maiúsculas comparam a mesma porção entre tratamentos e minúsculas diferentes porções no mesmo tratamento pelo teste de Kruskal-Wallis. *,** e ns: significativo a 1%, 5% e não-significativo, respectivamente. ¹Erro padrão da média.....* 126

CAPITULO 3

1. Análise de componentes principais (PCA) realizada com as variáveis da qualidade: crescimento do enxerto (E) e do porta-enxerto (PE), coloração (cor), grau de fusão (fusão) e massa de calos (massa) co-cultivados de 'Riesling'/'SO4'. Nesta etapa (1.1), os calos foram mantidos sem aplicação (CONTROLE) ou tratados com AIB (ácido indolbutírico), AIA (ácido indolacético), DBA (ácido 2,5 diclorobenzóico), BAP (6-benzilaminopurina), CIN (cinetina), HID (hidroquinona) e FLO (floroglucinol), na dose referência ($5,00 \text{ mg l}^{-1}$) (A). A partir dos compostos selecionados (quadrado azul em A), realizou-se nova PCA (B) com as mesmas variáveis da qualidade, considerando como tratamentos doses variando de $0,25$ a 20 mg l^{-1} (B). As doses otimizadas selecionadas estão no quadrado azul em B (em mg l^{-1}). *Barras múltiplas de desvio padrão ($\pm 2\sigma$) não sobrepostas indicam discriminação amostral entre grupos com distintos tamanhos de efeito.....* 157
2. Variação do indicador da qualidade da fusão de calos co-cultivados ($\text{RC}_{\text{invitro}}$) (A) e da qualidade de mudas enxertadas ($\text{RC}_{\text{invivo}}$) (B) em função da variação do indicador 'peso acumulado' da $\text{PC1}+\text{PC2}$ na PCA, para sete formulações de reguladores de crescimento (doses em mg l^{-1}) (descrição das siglas na legenda da Fig.01) e mais a formulação PADRÃO (cera com DBA) (apenas em B), nas seguintes combinações enxerto/porta-enxerto: 'Riesling Itálico' e 'Bordô' em: 'SO4', 'P1103' e 'VR043-43'. Barras múltiplas de desvio padrão ($\pm 2\sigma$) não sobrepostas indicam discriminação amostral entre grupos com distintos tamanhos de efeito. *Quanto maior o valor do 'RC' e do 'peso acumulado' maior a capacidade da formulação em aumentar a qualidade de calos cofusionados e mudas enxertadas em relação ao CONTROLE.....* 158

3. Classificação das formulações nas etapas finais da prospecção *in vitro* (A) (etapa 1.3) e da validação *in vivo* (B) (etapa 2.1) para obtenção, respectivamente, de formulações candidatas e promissoras, dentre sete formulações de reguladores de crescimento (doses em mg l⁻¹) (descrição das siglas na legenda da Fig.01) e mais a formulação PADRÃO (cera com DBA) (apenas em B), nas seguintes combinações E/PE: 'Riesling Itáliaico' e 'Bordô' em: 'SO4' , 'P1103' e 'VR043-43'. Média entre classificadores nas cultivares enxertadas em 'SO4' mais 'P1103' (*) e para as seis combinações (**). *O classificador foi obtido a partir da média aritmética entre os indicadores 'RC' e 'peso acumulado' (extraídos a partir na Fig.2). Formulações com valores positivos no eixo x destacam-se por maior resposta da qualidade de calos fusionados e mudas enxertadas em relação ao CONTROLE.....* 159
4. Aspecto de calos, após 30 dias de co-cultivo pelos tratamentos que representam os enxertos ('Riesling' e 'Bordô') combinados aos porta-enxertos ('VR043-43', 'P1103' e 'SO4') sob efeito das formulações candidatas (doses em mg l⁻¹) (A): BAP(1,0), AIA(2,5)+BAP(1,0), DBA(1,75)+BAP(1,0) e com o tratamento CONTROLE (sem aplicação de formulação). Linha vertical amarela e horizontal preta: exemplifica a região em que ocorreu a fusão entre enxerto - E e porta-enxerto – PE. (NS) Médias (±desvio padrão) seguidas de mesma letra não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05). (---) Tratamento não aplicado. *C_{invitro}: quanto mais acima de zero e próximo ao valor 1,00, maior a qualidade dos calos cofusionados na condição CONTROLE. Calos fusionados in vitro, com coloração amarelo-pardo são indicativos de danos por oxidação dos tecidos. Calos de enxertia in vivo, na sua dimensão frontal e lateral, após 30 de forçagem, em três taxas de formação (conforme escala proposta por Celik, 2000): alta (entre 75 e 100%), moderada (entre 75 e 25%) e baixa (abaixo de 25%) (B).....* 160
5. Variação dos indicadores da qualidade dos calos cofusionados (RC_{invitro} e C_{invitro}) (A) e das mudas (RC_{invivo} e C_{invivo}) (B) para três formulações de reguladores de crescimento (doses em mg l⁻¹) (descrição das siglas na legenda da Fig.01) mais a formulação PADRÃO (cera com DBA) (apenas em B), nas seguintes combinações E/PE: 'Riesling Itáliaico' e 'Bordô' em: 'SO4', 'P1103' e 'VR043-43'. Na formulação AIA(2,5)+BAP(1,0) para os enxertos em 'SO4', 'P1103' e BAP(1,00) em 'VR043-43', detalha-se a resposta de RC_{invivo} e RC_{invitro} entre cultivares enxertadas para o mesmo porta-enxerto (C). *Em A e B, barras sobrepostas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula entre combinações e minúscula entre formulações, pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05). ¹Erro padrão da média. Os indicadores C_{invitro} (A) e C_{invivo} (B) representam a variação do tratamento CONTROLE entre combinações (extraídos da Fig.4A e Tab.1G, respectivamente).....* 162

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o setor vitivinícola brasileiro passa por uma remodelação da sua matriz produtiva. No que se refere à implantação dos vinhedos, a origem do material vegetal era, até então, visto como um insumo secundário. A produção da muda na propriedade sempre foi uma tradição cultural dos viticultores, especialmente na Serra Gaúcha, principal região de produção de uvas do país (Nachtigal e Schneider, 2007). Nesta região, em torno de 55% dos vinhedos em produção foram implantados a partir de mudas produzidas na propriedade (Mello e Machado, 2017). Contudo, a queda na disponibilidade de mão-de-obra no campo, a necessidade de redução dos custos de produção e a obrigatoriedade por crescente competitividade com o mercado externo têm levado a queda desta prática. Com este novo cenário, foi estabelecida uma maior demanda por mudas enxertadas, produzidas por viveiristas comerciais, cujo nível tecnológico, no entanto, ainda é baixo.

No Brasil, o sistema usual de produção de mudas nos viveiros tem sido a garfagem manual, com enxertia a campo (Nachtigal e Schneider, 2007). Destaca-se que, da mesma forma, quando produzida na propriedade, o sistema de enxertia é o mesmo. Por sua vez, nos principais países com tradição vitícola o sistema de enxertia de mesa (tipo ômega) é o mais utilizado (Regina, 2002a). Aplicando esse sistema mais controlado, obtêm-se mudas com padrões morfológicos e fitossanitários mais elevados do que aquelas produzidas de forma manual.

Apesar do protocolo da enxertia de mesa estar definido desde a década de 1960 na Europa e ter sido introduzido no Brasil nos anos 2000 (Kuhn *et al.*, 2007), poucos viveiristas no país aplicam esse sistema de forma plena. De forma geral, a maioria esbarra em algumas limitações técnicas que dificultam sua aplicação. Dentre estas, sem os devidos ajustes, destaca-se a restrita produção de mudas na enxertia de mesa, que não atende à demanda nacional. Empregando o protocolo importado de enxertia de mesa, os viveiristas brasileiros geralmente obtêm um rendimento de 50% na produção de mudas. No sistema manual, este rendimento

fica em torno de 90% (Kuhn *et al.*, 2007). Isto evidencia claramente a necessidade de ajustes neste protocolo importado, visando o aumento no rendimento de mudas para viabilizar sua adoção pelos viveiristas brasileiros.

Outro fator que tem contribuído para a evolução do protocolo de produção de mudas é o fitossanitário. Na principal região vitícola do estado e do Brasil (Serra Gaúcha) tem sido registrado desde o início dos anos 2000 um problema crescente de fitossanidade, denominado “declínio e morte de vinhedos”. Conforme Garrido *et al.* (2004), este problema é causado por fatores bióticos e abióticos, os quais proporcionam uma redução contínua do crescimento e do potencial produtivo, resultando na morte no período de três a cinco anos após o plantio. Dentre os fatores bióticos relacionados ao declínio, destaca-se a incidência dos complexos dos fungos causadores da “doença de tronco” (Cavalcanti *et al.*, 2013). Hoje, sabe-se que a principal forma de introdução destes fungos nos vinhedos ocorre através das mudas, produzidas em viveiros comerciais (Monis, 2012). Da mesma forma, as mudas produzidas na propriedade tendem a seguir procedimentos técnicos que também acabam favorecendo a elevada infecção por estes fungos.

Levantamento realizado por Lerin *et al.* (2016) em mudas de videira disponibilizadas na Serra Gaúcha, concluiu que quase a totalidade (85%) apresentava pelo menos um dos fungos relacionados ao declínio. Ou seja, independentemente se a muda é comercial ou produzida na propriedade, ambas se tornaram fontes de dispersão desta doença, pois o sistema de produção, nas duas condições, praticamente é o mesmo. Portanto, todo esse cenário tem impulsionado a redução (ou paralisação) da produção de mudas nas propriedades, bem como a implantação de medidas nos viveiros comerciais para prevenir a ocorrência e dissipação destes fungos.

Além da questão fitossanitária, alguns trabalhos têm revelado, também, a ocorrência do problema “enxertia anormal” da videira, que não está diretamente associado às causas fitopatogênicas (Gardiman *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2013). Trata-se de uma conexão vascular ineficiente entre enxerto e porta-enxerto, reduzindo a taxa de sobrevivência da muda, tanto no viveiro como no futuro vinhedo. Mudas com baixa qualidade morfológica foram reportadas por Grohs *et al.* (2015a) na Serra Gaúcha, sendo a soldadura incompleta da enxertia, parâmetro considerado para avaliação da qualidade fitotécnica das mudas produzidas (Grohs *et al.*, 2015b). Dentro das pesquisas relacionadas à enxertia anormal ou soldadura incompleta destaca-se a abordagem fisiológica, que apesar do principal enfoque

estar na cicatrização da enxertia (calogênese), não é possível dissociar de outros dois importantes fatores que podem ocorrer concomitantes: a brotação e o enraizamento. No entendimento destes processos, têm ocorrido alguns avanços com estudos anatômicos, na caracterização da calogênese e formação de novos tecidos e fisiológicos, com a quantificação de metabólitos envolvidos de modo direto ou indireto. São clássicos os trabalhos relacionados à quantificação hormonal endógena, especialmente de auxinas e citocininas entre enxerto e porta-enxerto sobre a qualidade da calogênese (Darikova *et al.*, 2011). A quantificação destes hormônios pode ser empregada na caracterização da qualidade fisiológica de mudas, na predição dos riscos da enxertia anormal e na definição de insumos para favorecer a calogênese. Portanto, esta caracterização básica se apresenta como etapa essencial no ajuste de protocolos que possam aumentar o rendimento de mudas com alta qualidade fitotécnica.

Dentre os possíveis ajustes que podem ser considerados na obtenção de mudas de qualidade fitotécnica, destacam-se: o aprimoramento do manejo das plantas matrizes no jardim clonal (campo onde são coletados os sarmentos para enxertia) e do manejo das mudas na forçagem (ambiente controlado onde é realizada a indução da calogênese de enxertia). O manejo das plantas matrizes, nas condições do Sul do Brasil (estados do RS, SC e PR), ainda é pouco compreendido pelos viveiristas, principalmente nos aspectos básicos da cultura que levam aos riscos da má formação de mudas. Dentre estes aspectos está a época adequada de coleta das estacas (sarmentos). A variabilidade interanual das condições meteorológicas no período hibernar no Sul do Brasil (Mandelli *et al.*, 2003), proporciona mudanças significativas no estado de dormência e, conseqüentemente, no potencial de brotação das videiras de cada ano (Hawerroth *et al.*, 2010). Portanto, essa variabilidade compromete diretamente o potencial de formação de mudas em cada ano. Apesar dessa importância, são escassos os estudos que indiquem ao viveirista as épocas ideais de coleta, considerando o acúmulo de horas de frio que atenda a superação do estado de dormência. Com essa carência, a tomada de decisão ocorre de modo empírico, atingindo ótimos rendimentos de mudas em alguns anos e baixos em outros. Para o atendimento deste desafio torna-se necessária uma revisão no atual protocolo de produção de mudas, testando épocas para coleta de sarmentos dos principais genótipos e as interações destas coletas com a variação do tempo de armazenamento em câmara frigorífica. Essa abordagem poderá auxiliar os viveiristas na identificação dos

fatores de maior impacto sobre a perda de qualidade na formação das mudas, ainda na etapa de pré-enxertia.

Na forçagem, vários aspectos podem determinar benefícios na qualidade de mudas. Dentre estes, destaca-se o uso da cera de enxertia enriquecida com auxina sintética (Kuhn *et al.*, 2007; Regina, 2002a). Esse procedimento, desenvolvido especialmente para os genótipos e as condições europeias, tem sido adotado como um padrão para garantia de calogênese. Contudo, nas condições climáticas no Sul do Brasil, como se adotam outras combinações de enxertos e porta-enxertos (ex.: híbridos de *Vitis labrusca*), essa cera comercial importada não tem sido eficaz e não se dispõe de alternativas de ceras que sejam ajustadas a esta realidade. A combinação de variedades-copa de origem americana em porta-enxertos de origem brasileira ou europeia é específica do Brasil, não sendo utilizada em nenhuma outra região vitícola do mundo (Protas e Camargo, 2011). Desta forma, quando os viveiristas utilizam ceras de enxertia importadas, não são obtidas mudas com as mesmas qualidades de calo e taxa de sobrevivência. Como exemplo, Regina *et al.* (2012) obtiveram uma variação de 8 a 74% no índice de sobrevivência de mudas da cultivar Chardonnay enxertada (sistema de mesa com cera comercial) sobre treze variedades de porta-enxerto. Adicionalmente, mesmo em mudas classificadas como viáveis, têm sido observados com frequência problemas relacionados às conexões vasculares irregulares, devido à restrita calogênese no ponto de enxertia, predispondo as plantas ao declínio (Stamp, 2001).

Na produção de ceras de enxertia, resultados promissores começam a ser obtidos a partir da prospecção de novos compostos e doses que possam favorecer a calogênese de combinações locais de enxerto e porta-enxertos (Iliev *et al.*, 2014; Köse e Güleriyüz, 2016). Embora alguns trabalhos tenham sido desenvolvidos com sucesso nas principais regiões vitícolas no mundo, no Brasil, este tipo de estudo ainda não foi iniciado. Em função disso, atualmente muitos viveiristas interessados na produção de mudas por enxertia de mesa têm importado a cera de países europeus (em geral, França, Espanha ou Itália). Além do desconhecimento das restrições fitotécnicas destes produtos, muitos alegam que o custo de importação tem sido um fator limitante para a adesão ao sistema de enxertia de mesa. Diante deste cenário e com o mercado viveirista em expansão no Brasil, a demanda por uma formulação de cera ajustada à realidade nacional torna-se importante, sendo uma oportunidade para a pesquisa e inovação tecnológica deste setor.

Atualmente, há uma extensa variedade de compostos que podem induzir a formação de brotos, calos ou raízes, incluindo fitohormônios, compostos fenólicos e antioxidantes (Souza e Pereira, 2007). O uso destes compostos tem sido cada vez mais rotineiro na fruticultura, especialmente quando se busca maior proporção de mudas com qualidade comercial (Goulart *et al.*, 2011). Contudo, apesar do conhecimento de alguns efeitos biológicos isolados, os ajustes de doses e combinações mais eficazes são complexos. A construção de ensaios *in vivo* a partir de fatoriais completos é uma opção, mas proporcionam experimentos com grande número de interações, onerosos em tempo e recursos, sendo, em muitos casos, inviáveis para execução. Uma alternativa para contornar esse problema é a aplicação de ensaios *in vitro* (a partir da cultura de tecidos), seguindo modelos estratégicos que já são utilizados pela indústria farmacológica (Matos, 1997). Este tipo de abordagem tem sido eficaz para triagem de ativos químicos (prospecção) em curto espaço de tempo, com baixo custo e alto rendimento analítico.

Dentre as técnicas da cultura de tecidos, o co-cultivo de calos não diferenciados tem sido aplicado em estudos moleculares e anatômicos, relacionados à compatibilidade de fusão entre espécies ou cultivares (Pina *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2018). Portanto, o uso desta metodologia, na prospecção de formulações candidatas à indução da calogênese, pode ser uma estratégia viável, quando se vislumbra o ajuste da cera. Para isso, é imprescindível a validação das formulações obtidas *in vitro*, no sistema de enxertia de mesa, com as principais combinações de genótipos empregados no Brasil. O sucesso na abordagem conjunta destas estratégias (prospecção *in vitro* e validação *in vivo*) corresponderá a uma inovação no tema da propagação vegetal da videira, cujos princípios metodológicos também poderão ser explorados em outras espécies frutíferas.

Hipóteses

1. Nas condições da Serra Gaúcha, em diferentes combinações de enxerto e porta-enxerto, é possível definir uma sincronia da época de coleta de estacas a campo com o tempo de armazenamento em câmara frigorífica que favoreça altos índices de formação de mudas em pós-forçagem;
2. O perfil fitohormonal de mudas, após a etapa de forçaçagem, reflete os diferentes níveis de qualidade fitotécnica do enxerto e porta-enxerto, indicando os fitohormônios mais associados com a indução de calogênese, brotação e enraizamento;

3. O co-cultivo de calos *in vitro* é uma metodologia que permite de forma rápida a prospecção de formulações promissoras para indução da calogênese *in vivo* de diferentes combinações de enxerto e porta-enxerto.

Objetivo geral

Desenvolver e validar ajustes fitotécnicos para a obtenção de mudas com elevada capacidade de formação de calos, brotação e enraizamento em pós-forçagem (pré-plantio), adaptado às diferentes combinações de enxerto e porta-enxerto da viticultura no Sul do Brasil.

Objetivos específicos

1. Caracterizar a qualidade fitotécnica de mudas, produzidas a partir de diferentes épocas de coleta de material propagativo em plantas matrizes, interagidas com tempos de exposição ao frio artificial de câmara frigorífica;
2. Testar o etefon como forma de antecipar o estado de dormência e a coleta de material propagativo no outono, sem a perda de qualidade fitotécnica das mudas produzidas;
3. Avaliar o perfil fitohormonal em diferentes porções da muda (enxerto, corte de enxertia e porta-enxerto) através da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), associando a variabilidade quantitativa de cada classe hormonal com as respostas da qualidade fitotécnica das mudas;
4. Testar a viabilidade da técnica do co-cultivo de calos *in vitro* para prospecção preliminar de formulações promissoras de reguladores de crescimento na calogênese de enxertia *in vivo* em videira, com benefícios sobre a brotação e enraizamento.

O presente trabalho de tese está estruturado em três conjuntos experimentais, os quais definiram os capítulos I, II e III. O capítulo I foi direcionado ao cumprimento dos objetivos específicos 1 e 2; o capítulo II ao do 3 e o capítulo III, no cumprimento do objetivo 4. Os experimentos do capítulo I envolvem ensaios *in vivo*, onde foram coletadas amostras que foram empregadas nas análises laboratoriais do capítulo II. No capítulo III foram utilizados experimentos realizados inicialmente na condição *in vitro* e, posteriormente, validados *in vivo*. Todos os experimentos foram realizados na Embrapa Uva e Vinho, localizada no município de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No Brasil, a viticultura ocupa uma área de 75.951 ha e é realizada em 18 estados (Mello, 2019). A produção de uvas encontra-se principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste com destaque para os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco (Protas e Camargo, 2011). Os Estados da região Sul concentram 73% da área plantada com videiras no Brasil, com destaque para o Rio Grande do Sul (RS). O estado contempla 85% da área plantada e 52% do total da produção nacional, destacando a produção de vinhos (85% do total produzido no Brasil) e suco integral (Mello, 2019). Especificamente, somente a região vitícola da Serra Gaúcha do RS, que abrange 19 municípios, é responsável por 80% da produção estadual de uvas (Mello e Machado, 2017). Diante desta representatividade, este trabalho de pesquisa teve como maior foco a viticultura no Sul do Brasil, apesar dos avanços obtidos terem potencial de aplicação em outras regiões vitícolas do país e do mundo.

2.1 A produção de mudas na viticultura no Sul do Brasil

2.1.1 Descrição do atual setor viveirista

De forma geral, a viticultura no Sul do Brasil caracteriza-se pela ampla diversidade, em função das distintas características edafoclimáticas e culturais das principais regiões produtoras. Conforme Camargo *et al.* (2011), esta diversidade resulta em objetivos variáveis de produção que, por consequência, empregam diferentes combinações de enxerto e porta-enxerto. Na Serra Gaúcha, as variedades mais utilizadas para produção de vinhos de mesa e suco são 'Bordô' e 'Isabel' (ambas de origem americana, *Vitis labrusca*) e predominantemente combinadas ao porta-enxerto 'Paulsen 1103' (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*). Em Santa Catarina, o destaque é a região do Vale

do Rio do Peixe, com a produção de suco integral a partir das uvas 'Isabel' e 'Bordô', combinadas ao porta-enxerto 'VR043-43' (*Vitis rotundifolia* x *Vitis vinifera*). No Paraná, o destaque é a região norte, com a maioria da produção focada em uvas de mesa finas (como 'Itália', de origem europeia, *Vitis vinifera*), combinadas principalmente ao porta-enxerto 'IAC 572' (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris* x *Vitis caribaea*).

A variabilidade das combinações enxerto/porta-enxerto utilizadas no Brasil é um reflexo da viticultura moderna, que adotou diferentes genótipos de porta-enxertos para superar os contrastes de estresses bióticos e abióticos de cada local. A adoção de porta-enxertos ocorre desde o século 19, quando a praga filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) devastou os vinhedos franceses alastrando-se pelas principais regiões vitícolas da Europa (Granett *et al.*, 2001). Conforme os autores, inicialmente os porta-enxertos foram selecionados com base em sua resistência à filoxera e, posteriormente, pela sua adaptação aos diferentes solos, climas e capacidade de indução de vigor a cultivar-copa. A partir de então, ocorreu um aumento do uso de mudas enxertadas, impulsionando a evolução das técnicas de propagação. Atualmente, o sistema de enxertia de mesa do tipo ômega tem sido o padrão de propagação utilizado nos países com tradição vitícola (Regina, 2002a). Como diferencial deste sistema, destacam-se a racionalização da mão de obra pela mecanização do processo e a garantia de um padrão morfológico único das mudas produzidas (Regina, 2002b).

A realidade da produção de mudas no Brasil ao longo dos anos tem se mantido aquém do sistema de mesa. Culturalmente, a produção de mudas sempre foi realizada na propriedade, utilizando o sistema de enxertia manual a campo (Nachtigal e Schneider, 2007). Conforme Mello e Machado (2017), a proporção de vinhedos, no Rio Grande do Sul, formados a partir de mudas enxertadas pelos próprios viticultores até 2015 foi de 55% da área total, enquanto somente 11% foram formados através de mudas adquiridas em viveiros comerciais. O restante da área (34%) é formado de mudas não enxertadas (sem utilização de porta-enxertos) obtidas tanto em viveiros quanto produzidas na propriedade. Porém, esse cenário está em mudança, pois tem sido observada a tendência de crescimento no segmento de mudas. Apenas no Rio Grande do Sul, o número de unidades produzidas em viveiros comerciais cresceu 22% no período de 2008 a 2015 (Mello e Machado, 2017). Além disso, os viticultores têm

buscado implantar novas áreas a partir de mudas enxertadas (em detrimento às mudas sem porta-enxerto), ocasionando um incremento por este tipo de produto (Mello e Machado, 2017). Adicionalmente, o crescimento no interesse por mudas comerciais tem sido alavancado pela menor disponibilidade de mão-de-obra no campo com qualificação para realizar enxertias, e a crescente exigência pelo setor produtivo quanto à qualidade fitossanitária das mudas utilizadas nos vinhedos.

2.1.2 A qualidade de mudas e o declínio da videira

A maior demanda por mudas livres de enfermidades tem ocorrido na região Sul do Brasil, em especial na Serra Gaúcha, e isto está associado ao aumento de um problema fitossanitário que têm se alastrado pelos vinhedos desde os anos 2000, denominado “declínio e morte precoce de vinhedos” (Garrido *et al.*, 2004). Trata-se de um problema multifatorial e, dentre os fatores bióticos associados a este declínio, foram destacados inicialmente as pragas de solo, como a pérola-da-terra (*E. brasiliensis*) (Botton *et al.*, 2011), e as viroses da videira (em especial o *Grapevine virus B*, *Grapevine virus A*, *Rupestris stem pitting-associated vírus* e *Grapevine leafroll-associated virus 3*) (Martelli, 1999). Contudo, mais recentemente, tem sido registrado uma alta incidência de doenças fúngicas de tronco e raízes nas plantas com sintomas de declínio, tais como: podridão descendente (*Botryosphaeria* spp., *Eutypa lata* e *Phomopsis viticola*), doença de Petri (*Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella chlamydospora*), Esca (*Phaeoacremonium* spp., *P. chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea* e *F. australiensis*) e pé preto (*Cylindrocarpon* spp., *Ilyonectria* spp. e *Campylocarpon* spp.) (Cavalcanti *et al.*, 2013). Em levantamento realizado na Serra Gaúcha foi verificado que 48% das plantas com sintomas de declínio apresentavam a incidência de fungos da parte aérea e 66% fungos do sistema radicial (Garrido *et al.*, 2004).

Mais recentemente, trabalhos que buscam a origem da introdução dos fungos de tronco nos vinhedos têm indicado os viveiros como a maior fonte de dispersão destes patógenos. O grau de contaminação foi considerado tão alarmante que, em 2012, o “Comitê Internacional para estudo das Doenças de Tronco” determinou a urgência na revisão dos atuais protocolos de produção das mudas de videira comercializadas na União Europeia (Monis, 2012).

Corroborando com estes trabalhos, Lerin *et al.* (2016) realizaram um levantamento em viveiros da Serra Gaúcha e verificaram que 85% das mudas comerciais apresentavam pelo menos um dos fungos relacionados ao declínio. Nestes dados, destacaram uma alta incidência de infecção na região de enxertia, em especial, com os fungos causadores de Podridão Descendente (23% das amostras) e Petri (53%). De acordo com os autores, infecções na região de enxertia ocorrem ainda no viveiro a partir da contaminação de ferramentas, material propagativo e canteiros de enraizamento.

Além do aspecto fitossanitário, em diversos países vitícolas, tem sido relatado com frequência um evento denominado “enxerto anormal da videira” (Gardiman *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2013). Neste problema ocorre uma baixa calogênese na região de enxertia, facilitando a quebra da muda ou da planta adulta anos após o plantio e não têm relação direta com a contaminação por fungos. Em viveiros da Califórnia, por exemplo, Stamp (2001) registrou que 39% das mudas apresentavam algum tipo de defeito, sendo o principal (13%) de mudas com falhas na enxertia. Portanto, excluindo-se os fatores fitossanitários relacionados à qualidade das estacas e/ou do controle ao longo processo de produção, abre-se também a discussão sobre a qualidade fisiológica e fitotécnica durante a formação das mudas. Esta qualidade engloba os processos fisiológicos associados ao controle da brotação, a formação do calo e feixes vasculares na região de enxertia e a diferenciação e crescimento de novas raízes.

2.2 Aspectos fisiológicos na formação de mudas

O processo chave na enxertia é a calogênese, definido por Pina e Errea (2005), como uma resposta natural ao estresse de dano ou ferimento dos tecidos. A partir desta se forma o calo de enxertia, definido como uma massa irregular de células do parênquima em diferentes estádios de lignificação. O processo fisiológico, que ocorre ao longo da união entre enxerto e porta-enxerto (chamado “ontogenia da enxertia”) se resume em três etapas de (Pina e Errea, 2005): 1ª) contato cambial entre enxerto e porta-enxerto, com a proliferação de células parenquimáticas na zona de contato (calo de enxertia); 2ª) diferenciação de novas células cambiais a partir do calo, com a consequente formação e extensão das fibras do xilema de reparo e, posteriormente, do floema de reparo;

e 3ª) conclusão da conexão vascular da enxertia a partir da formação completa do xilema e floema, dando início à atividade cambial. Havendo sucesso nestas etapas, o enxerto é considerado funcional, pois as primeiras exigências na formação da muda foram cumpridas.

A partir de plantas modelo de *Arabidopsis*, Yin *et al.* (2012) verificaram que, após 24 h da enxertia, houve aumento no acúmulo de auxinas na região da conexão. Com este fator de estímulo à diferenciação celular, após 48 h ocorreu a formação do calo de enxertia e em 72 h foi detectado o transporte ativo entre o enxerto e porta-enxerto. Com esses resultados, estes autores revisaram e atualizaram as etapas de ontogenia da enxertia, para: 1º) resposta molecular inicial induzida pelo ferimento (corte da enxertia); 2º) ativação da divisão celular nas camadas de células próximas do corte, seguido da limpeza dos detritos celulares; 3º) restabelecimento da comunicação celular entre enxerto e porta-enxerto, via plasmodesmatas; 4º) acúmulo de auxina em grupos específicos de células, marcando posições no calo de enxertia; 5º) proliferação da divisão celular e diferenciação, e 6º) conexão de feixes vasculares entre enxerto e porta-enxerto, com a definição do câmbio vascular.

A 6ª etapa (vascularização) é crucial para o sucesso da enxertia e qualidade da muda, pois qualquer disfunção nesta fase final resulta em morte da muda ou riscos futuros de incompatibilidade de enxertia. Segundo Pereira *et al.* (2014), incompatibilidade é definida como um desenvolvimento anormal do enxerto em razão de diferenças anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares em relação ao porta-enxerto, resultando em prejuízo visível ou não na união do enxerto, além de crescimento vegetativo retardado, baixa produtividade e, em casos severos, morte da planta. O nível de incompatibilidade pode ser classificado, de acordo com o tipo de dano nas plantas, em translocado ou localizado (Mosse, 1962). No caso da incompatibilidade localizada ocorre o desenvolvimento irregular e visível da região de enxertia. Em geral, este evento é fortemente relacionado aos danos anatômicos no ponto da enxertia, decorrente das falhas no processo de produção da muda (Gardiman *et al.*, 2007). As fissuras causadas na região da enxertia criam portas de infecção para os fungos de tronco (Gramaje e Armengol, 2011). Neste caso, a morte da planta ocorre ainda nas condições de viveiro, havendo elevado índice de perda de mudas. Mas quando o efeito for intermediário, a planta apresenta conexões vasculares de

floema e xilema entre enxerto e porta-enxerto funcionais, porém irregulares (Hunter *et al.*, 2013). Neste caso, ocorre seu desenvolvimento nos viveiros e o início do processo sintomático de incompatibilidade só acontece após o plantio no vinhedo, devido a ineficiência no transporte de água, nutrientes e fotoassimilados (Hunter e Ruffner, 2001). Muitas vezes, nas plantas afetadas por este tipo de incompatibilidade, há um engrossamento da região da enxertia, relacionado com a presença de camadas de células mortas na região de união e com as involuções no câmbio (Herrero, 1951).

A incompatibilidade translocada não expressa danos visíveis na região da enxertia, porém determina a queda do desenvolvimento das plantas após o plantio (Mosse, 1962). Geralmente, plantas com este tipo de incompatibilidade apresentam vascularização funcional, mas ineficiente (Hunter e Ruffner, 2001). Conforme os autores, esta incompatibilidade é determinada por alterações moleculares ou bioquímicas durante a fusão do enxerto ao porta-enxerto, que muitas vezes não estão associadas a modificações anatômicas visíveis. Por exemplo, Cookson *et al.* (2013) analisando a expressão gênica da interface enxerto/porta-enxerto em videira, indicam que concomitante com a expressão de genes associados ao reparo dos tecidos na posição de enxertia (ex.: metabolismo de parede celular, sinalização hormonal e metabolismo celular secundário) também está ocorrendo a expressão de genes que coordenam a reativação do crescimento dos meristemas na primavera. Portanto, se houver falhas no reparo da enxertia não haverá condições fisiológicas para suportar o crescimento dos demais tecidos que estão sendo ativados simultaneamente durante a formação inicial da muda, comprometendo o sincronismo e o sucesso de todos os processos. Este fato indica que os danos relacionados à enxertia anormal da videira podem iniciar ainda nas etapas anteriores ao enraizamento das mudas no viveiro.

Na obtenção de mudas com baixos riscos de incompatibilidade, especialmente do tipo localizada, espera-se que exista um equilibrado nível de calogênese durante a enxertia (Jonard *et al.*, 1990). Conforme os autores, quanto mais uniforme a formação do calo, menor será o risco de má formação vascular. Porém, durante a ontogenia de enxertia dois outros processos fisiológicos ocorrem e influenciam a calogênese, que são a brotação do enxerto e o enraizamento do porta-enxerto. Portanto, a qualidade da muda, no que se refere

a sua formação, é resultado dos múltiplos fatores que incidem sobre estes três processos fisiológicos: enxertia (calogênese), brotação e enraizamento (Hunter *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2009; Enders e Streider, 2015).

Tradicionalmente, durante a produção comercial das mudas, considera-se que a calogênese é obtida em uma etapa preliminar denominada “forçagem” (a ser detalhada no tópico a seguir), sendo as brotações e raízes obtidas em etapas posteriores, de aclimatação e enraizamento. Em função disso, Regina (2002a) destaca que durante a forçagem espera-se obter a menor formação de brotos e raízes para favorecer o máximo da calogênese, justificando-se que estes processos concorrem por reservas indispensáveis à sobrevivência da muda. Contudo, a formação de raízes na gema do porta-enxerto concomitante à calogênese pode favorecer a formação das conexões vasculares, devido o aumento do fluxo basipetal de auxinas dos meristemas apicais para esta região (Enders e Streider, 2015). Da mesma forma, a ocorrência de um primórdio radicial e a formação de calo na base das estacas pode favorecer a defesa física da futura muda contra a infecção por patógenos de solo na etapa de enraizamento no viveiro (Diaz *et al.*, 2009). O desafio, portanto, é obter a sincronia no tempo e na intensidade de formação destes processos, desde as etapas iniciais da formação da muda. Este sincronismo pode estar sendo definido não apenas pelas condições de forçagem, mas também pelas condições que antecedem essa etapa, como, por exemplo, a época de coleta dos sarmentos nas plantas matrizes, em função do estado fisiológico que se encontram.

2.3 Enxertia de mesa e os fatores que afetam a formação da muda

Considera-se que dentre os sistemas de enxertia utilizados na produção de mudas de videira, destaca-se o de “mesa do tipo ômega” como o mais difundido nas principais regiões vitivinícolas do mundo desde a década de 60 (Regina *et al.*, 2002a). Este sistema viabilizou a produção de mudas em escala industrial, tendo como elemento central a utilização de uma máquina semiautomatizada para a realização da enxertia (Alley, 1957). Entretanto, salienta-se que, além da máquina, este sistema engloba outras etapas obrigatórias, como a parafinação e a forçagem.

De forma resumida, a etapa de parafinação consiste na utilização de uma cera enriquecida com auxina, sendo geralmente comercial e disponibilizada em estado sólido para ser derretida no momento do uso, em temperatura não superior a 70°C (Kuhn *et al.*, 2007; Regina, 2002a). A muda recém-enxertada é imersa na cera derretida por um período médio de 2 segundos, cobrindo a região do enxerto. Posteriormente, ocorre a etapa da forçagem em que a muda é mantida em câmara com ambiente controlado, com ausência de luz, umidade acima de 85% e temperatura entre 27 e 28°C. Neste ambiente, por um período não superior a 35 dias, busca-se a máxima formação do calo de enxertia. Após, as mudas são aclimatadas à sombra, em temperatura e umidade ambiente e por um período de cinco a dez dias até o plantio no viveiro.

Regina *et al.* (2012) evidenciaram que os percentuais de mudas com formação de calo após a etapa de forçagem ficam em torno de 90 a 100%. Entretanto, os percentuais de mudas viáveis, após a sua colheita na etapa de viveiro (“pegamento”), caem para um nível de 50 a 70%. Os autores justificam essa perda às baixas temperaturas do ar incidentes durante a etapa de viveiro que possivelmente inibiram a formação das raízes. Porém, Hunter *et al.* (2003) destacam que o pegamento depende das quantidades prévias de reservas que os sarmentos dispõem para atravessar o período inicial da etapa do enraizamento no viveiro. Este fato confirma o conceito de que estresses no estado fisiológico do material propagativo ainda nas etapas iniciais à formação da muda (neste caso no matrizeiro) resultam na má formação das conexões inter-vasculares do enxerto e, por consequência, na ativação do mecanismo de incompatibilidade ou anormalidade (Hunter *et al.*, 2013).

Os estresses podem ser causados por diversos fatores, sendo que, neste projeto, no contexto da vitivinicultura no Sul do Brasil, serão abordados alguns, tais como: 1) estado de dormência e da necessidade de calor; 2) equilíbrio fitohormonal; 4) compostos fenólicos e 5) combinação genética entre enxerto e porta-enxerto.

2.3.1 Efeito do estado de dormência e da necessidade de calor

No sistema de enxertia de mesa, antes de qualquer etapa, o material propagativo (sarmentos) deve estar em dormência (estacas lenhosas), tanto nas cultivares de enxerto como porta-enxerto (Kuhn, 2003). Conforme estes autores,

tradicionalmente, espera-se a eminência da brotação para a realização das coletas (máximo acúmulo de horas-frio no campo). Contudo, essas coletas não consideram o estado de dormência dos sarmentos, que pode variar entre anos, em função da variabilidade na disponibilidade de frio (Alves *et al.*, 2019).

Nas condições climáticas no Sul do Brasil, este período hibernal de dormência é bem definido nas plantas de clima temperado, sendo ativado nos primeiros frios de outono e superado com o acúmulo de frio durante o inverno (Hawerth *et al.*, 2010). Portanto, a superação plena da dormência torna-se um fator elementar para o início das atividades metabólicas durante a formação da muda, envolvendo os processos de calogênese, brotação e enraizamento.

A dormência é um processo que envolve a suspensão temporária do crescimento vegetativo nas plantas (paralisação dos meristemas), para aquisição de resistência ao frio (Lang *et al.* 1987). O grau de dormência é dependente do perfil das substâncias reguladoras de crescimento (ex.: RNA, hormônios, etc.) que afetam múltiplos processos fisiológicos. A dormência pode ser classificada em três grupos, conforme Lang *et al.* (1987): paradormência, endodormência e ecodormência. A paradormência é determinada pela influência de outro órgão vegetal sobre a gema, levando à inativação da atividade metabólica do meristema vegetal ou floral. Um exemplo deste tipo é a dominância da gema (ou meristema) apical sobre o desenvolvimento das gemas axilares ou laterais. A endodormência se refere à paralisação do metabolismo das gemas em função da redução do fotoperíodo ou primeiros frios de outono, visando garantir a sobrevivência das plantas em condições ambientais desfavoráveis, como temperaturas congelantes. Para superar este tipo de dormência e a capacidade de brotação seja retomada, as gemas devem ser previamente expostas a um somatório de frio, imposto pelo inverno. Por fim, a ecodormência ocorre somente após a superação da endodormência e se caracteriza pela incapacidade de as gemas brotarem em função do ambiente, como a permanência de baixas temperaturas (primavera fria) ou restrição hídrica. Diante do exposto, a endodormência torna-se a etapa de maior importância para a propagação de mudas no Sul do Brasil, pois impacta diretamente na qualidade da brotação durante a formação da muda.

Diversos fatores do ambiente (ex.: temperatura, fotoperíodo, luminosidade e precipitação pluviométrica) interagem com variáveis das plantas (ex.: genótipo

da combinação copa e porta-enxerto, localização e tipo de gema e etc.), gerando contrastes nos reguladores de crescimento e na profundidade de dormência (Hawerth *et al.*, 2010). Dos fatores ambientais, a temperatura exerce a maior influência sobre a dormência, pois com a redução ao longo do outono estimula o acúmulo do ácido abscísico (ABA) e, conseqüentemente, a restrição metabólica na planta (Vergara *et al.*, 2017). O ABA impede a formação das proteínas relacionadas ao crescimento vegetal a partir da inibição da síntese de RNA's mantendo a planta em metabolismo basal e ativando a senescência foliar. Posteriormente, ao longo da dormência, as gemas apresentam elevada atividade dos genes da biossíntese do ABA (*VvNCED1* e *VvNCED2*), os quais reprimem os genes do ciclo celular (CCG). O aumento da concentração de ABA também sinaliza a repressão dos genes relacionados à biossíntese das auxinas e citocininas (Noriega e Pérez, 2017), reforçando a condição de inibição do crescimento vegetal neste período.

Diferentes condições de manejo ou de ambientes podem também desencadear previamente nos ramos de enxerto ou porta-enxerto, além do ABA, a formação das EROS (espécies reativas de oxigênio): radicais superóxidos (O_2^-), dióxigênio singleto (1O_2), radical hidroxila (HO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Irisarri *et al.*, 2015). Os níveis de EROS também são estimulados nas gemas pela ocorrência de baixas temperaturas do outono e durante a endodormência, contribuindo com a inibição do crescimento (Albuquerque e Albuquerque, 1982). O aumento das EROS leva a um processo oxidativo celular intenso como: peroxidação da membrana lipídica, oxidação proteica, inibição enzimática e danos ao RNA e DNA. Dentre as EROS, destaca-se o peróxido de hidrogênio, o qual confere às gemas tolerância ao frio e controle da expressão/repressão de diversos genes reguladores de crescimento, incluído o metabolismo de fitohormônios (Pinto *et al.*, 2007).

Quando a endodormência é acionada, esta condição fisiológica permanece ativada até que certo número de horas de frio é atingido (soma de horas quando a temperatura está abaixo ou igual a $7,2^{\circ}C$) (Anzanello *et al.*, 2018). Conforme Beauvieux *et al.* (2018) durante a endodormência ocorre o acúmulo dos compostos inibidores de crescimento (ABA, EROS, etc.) com o objetivo de preparar e proteger os tecidos vegetais da planta contra o congelamento. Na medida em que a exigência em frio é atendida e as

temperaturas do ar aumentam, estes compostos passam a ser inativados pelo aumento da expressão de enzimas antioxidantes como: superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, peroxirredoxinas, glutathione peroxidase e catalase. Na enxertia de mesa esta reativação metabólica ocorre de forma artificial, durante a etapa de forçagem, com temperaturas entre 27 e 29°C (Regina, 2002a), porém, para que a brotação seja plena, as gemas devem ter recebido antes da enxertia o frio suficiente para superar a endodormência.

Nas condições hibernais do Sul do Brasil frequentemente ocorrem invernos amenos (Mandelli *et al.*, 2003) em que a quantidade de horas de frio exigida para superação da dormência não é atendida de forma plena. Além disso, Alves *et al.* (2019), analisando uma série histórica de dados meteorológicos (2009-2018) das regiões de Bento Gonçalves-RS, Vacaria-RS e Santana do Livramento-RS, evidenciam que há uma tendência de redução do frio nos últimos anos, em relação à média normal observada para o período de abril e setembro. Essas variações no acúmulo de frio normalmente estão associadas com a intercalação de altas temperaturas durante o período hibernal, as quais podem interferir no efeito do frio sobre a endodormência, causando atraso e irregularidades na brotação (Anzanello *et al.*, 2014). Ou seja, flutuações térmicas neste período fazem com que as plantas não atinjam a profundidade e uniformidade ideal de endodormência, além de não disporem de frio suficiente para superar este estado de repouso e atingir a brotação plena. Devido às altas temperaturas, há um aumento da respiração de manutenção dos tecidos, elevando o consumo de reservas, além de favorecer o estresse oxidativo pela elevação das EROS (especialmente o H₂O₂) a níveis tóxicos para a planta (Perez *et al.*, 2007). Estas respostas às condições térmicas podem ser influenciadas pelas condições de manejo, mas principalmente pelas exigências térmicas de cada genótipo (Anzanello *et al.*, 2018). Portanto, é normal que entre anos ocorram diferenças nos níveis de brotação de cada cultivar, mesmo quando são coletadas na mesma época (Mandelli *et al.*, 2003; Biasi *et al.*, 2010). Por este motivo, nas condições do Sul do Brasil, a identificação da época mais favorável para coleta do material propagativo nas plantas matrizes, para se obter os maiores ganhos de qualidade fitotécnica de mudas, torna-se questão importante para a pesquisa.

2.3.2 Efeito dos fitohormônios

Superada a endodormência, as partes do enxerto e porta-enxerto, na etapa de forçagem, retomam o metabolismo celular e a biossíntese hormonal, ativando os processos de formação da muda (calogênese, brotação e enraizamento). A calogênese é determinada especialmente pelo balanço dos níveis endógenos de fitohormônios entre enxerto e porta-enxerto, especialmente na relação entre auxinas e citocininas (Köse e Gülerüz, 2016; Nanda e Melnyk, 2018; Baron *et al.*, 2019), conforme detalhado a seguir.

As auxinas são os fitohormônios mais relacionados aos eventos da enxertia por serem os responsáveis diretos pela diferenciação dos tecidos do calo, induzindo a formação dos feixes vasculares (Aloni, 1980). Conforme Enders e Streider (2015), a auxina é prioritariamente produzida nas folhas em desenvolvimento e nos meristemas apicais caulinares (sendo sua forma natural endógena o AIA - ácido-3-indol-acético). O AIA é biossintetizado principalmente a partir do aminoácido triptofano (acumulado nos peroxisossomos), sendo submetido a diversos processos de conjugação ao longo da sua rota de síntese e decomposição. Todas as formas conjugadas são menos ativas, mas são utilizadas para a rápida conversão destas em AIA quando necessário, assim como, na regulação homeostática de outras auxinas na célula, como: AIB (ácido indol-butírico), metil-ester-AIA, ácido fenil-acético e ácido 4-cloro-indol-3-acético (Taiz e Zeiger, 2009). Durante a enxertia, a ocorrência do corte é o evento que desencadeia toda cascata de reações moleculares mediadas pelas auxinas (Enders e Streider, 2015). Conforme Nanda e Melnyk (2018), o bloqueio do fluxo polar natural da auxina e seu acúmulo acima da região do corte sinalizam a expressão do gene *ANAC071* e a inibição de *RAP2.6L*. Por outro lado, a diminuição de AIA na região abaixo do corte leva a um efeito contrário com a supressão de *ANAC071* e expressão de *RAP2.6L*. São estes dois genes que desencadeiam os processos de divisão celular dos tecidos vasculares na região da medula que, conforme Cookson *et al.* (2013), em videiras, ocorrem em até três dias após a enxertia. Além de *ANAC071* e *RAP2.6L*, Nanda e Melnyk (2018) também detalham a participação de outros genes envolvidos na enxertia, cujas transcrições também são ativadas pelas auxinas, destacando-se: *XTH19* e *XTH20*, que viabilizam a proliferação de células da medula no contato dos

tecidos, e *ARF's* 6 a 8 que promovem a expressão de *NAM*, *ATAF*, *CUC* e *ALF4*, os quais regulam a divisão celular na região do periciclo.

As citocininas, por sua vez, são biossintetizadas a partir da adenina nos plastídeos, numa reação catalisada pela proteína associada ao gene *IPT7*. O produto final desta reação é a zeatina, que atua de forma livre e abundante nas plantas. As citocininas ocorrem ainda nas formas conjugadas, como ribotídeos, ribosídeos ou glicosídeos, as quais são convertidas para formas livres e ativas quando necessário (Taiz e Zeiger, 2009). Na ontogenia da enxertia, as citocininas estão relacionadas à divisão celular e regulação cambial (Kieber e Schaller, 2014). Porém, conforme Baron *et al.* (2019), o mais significativo efeito das citocininas recai sobre a interação desta com a rota de sinalização das auxinas. A citocinina aumenta o transporte das auxinas durante a formação vascular pela regulação e distribuição das proteínas PIN. Além disso, a partir do corte de enxertia, a citocinina sinaliza a expressão de *WIND1*, que é relacionado com a formação de tecidos indiferenciados (calo). Em videiras, Cookson *et al.* (2013) evidenciaram que aos 28 dias da enxertia ocorre o aumento da expressão dos genes relacionados à biossíntese de citocininas. A partir disso, tem início os processos de brotação e enraizamento, aumentando também a atividade do metabolismo primário e secundário.

O balanço hormonal fundamentalmente é determinado pela regulação cruzada entre ambos fitohormônios. As rotas de transdução de sinal nunca funcionam isoladamente, mas sim como uma rede complexa de interações de sinalização. Estas interações podem ser agonísticas (aditivas ou positivas) ou antagonísticas (inibidoras ou negativas). Atualmente, tem sido mais aceito o conceito de regulação antagonística auxina-citocinina sobre o desenvolvimento da parte aérea e raiz, como apresentado por Pernisová *et al.* (2011). Conforme este conceito, na interação destes hormônios, de forma geral, o efeito das auxinas sobre as citocininas é predominante, sendo a intensidade deste controle célula-específico e influenciada pela concentração do fitohormônio e pelo do estágio de desenvolvimento da planta (especificidade espaço-temporal). Em contrapartida, a influência das citocininas sobre os níveis de auxinas é menor, estando mais relacionada às mudanças dos estágios de crescimento. Os autores também sugerem que há uma correlação inversa entre a sinalização por citocininas e auxinas, comprovado a partir de um modelo de regulação mútua.

Por este modelo, as aplicações exógenas de auxinas ou superprodução de AIA (por transformação) sempre induzem a redução do efeito das citocininas.

Quanto ao processo de brotação, este é ativado como consequência da superação do estado de endodormência das gemas (conforme já detalhado). Uma vez ativado o crescimento meristemático, assim como na enxertia, passa a ser controlado pelo balanço entre auxinas e citocininas, porém com a participação efetiva também das estrigolactonas (Nanda e Melnyk, 2018). Em videira, Noriega e Pérez (2017) observaram que estacas com uma gema, submetidas às condições de forçagem para brotar (23°C e 16h de fotoperíodo), na primeira semana canalizaram as auxinas através das proteínas PIN em direção às células do procâmbio existentes na região MAC (Meristema Apical do Caule), determinando os sítios de iniciação dos primórdios foliares. Após três semanas de exposição, nestes sítios ocorreu a máxima expressão dos genes *VvIPT1* e *VvYUC3*, responsáveis pela biossíntese de citocininas e auxinas, respectivamente.

Após o início da formação do broto, o balanço entre auxinas e citocininas se intensifica, atuando sobre toda dinâmica de desenvolvimento da parte aérea (Taiz e Zeiger, 2009). Enquanto que as auxinas exercem a dominância apical, restringindo os meristemas laterais (paradormência), as citocininas atuam de modo contrário, ativando a brotação de gemas axilares. O rompimento deste equilíbrio de atuação de ambos os hormônios é facilmente demonstrado com a decapitação do broto apical, cessando o fluxo basípeto de auxinas e liberando a formação de brotos laterais a partir da indução por citocinina transportada a partir das raízes ou sintetizada nos meristemas laterais. Ou seja, a expressão dos genes da biossíntese de citocininas na região nodal (*IPT1* e *IPT2*), pode ser reativada com a supressão da auxina (Taiz e Zeiger, 2009).

No processo de enraizamento também se destaca a importância do balanço entre auxinas e citocininas, exercendo controle sobre a atividade meristemática, a formação de raízes adventícias e a arquitetura radicial (Pernisová *et al.*, 2011). Na produção de mudas de espécies perenes, a formação de raízes adventícias é uma etapa crucial, pois é o tipo de raízes que é induzido na base de estacas vegetativas ou lenhosas. Raízes adventícias podem ser formadas a partir de células parenquimáticas, calos, câmbio e raios vasculares ou medulares existentes nesta região. Neste processo de

enraizamento, as auxinas e citocininas atuam de forma antagonística na zona do meristema apical radicial (MAR) (Kieber e Schaller, 2014). Enquanto que as auxinas induzem a divisão (proliferação) celular do MAR, as citocininas regulam a diferenciação das células na zona de alongamento celular. A auxina acumulada na região do MAR é resultado principalmente da biossíntese e fluxo da parte aérea (Ljung *et al.*, 2005). A organogênese induzida pela auxina também é acompanhada pelo aumento da sinalização das citocininas. Havendo acúmulo excessivo de auxinas nas raízes também há superexpressão da biossíntese da citocininas. Com elevados níveis de citocininas no MAR ocorre uma prematura diferenciação celular, resultando na inibição de raízes laterais ou na formação de primórdios anormais (Persinová *et al.*, 2011). Por outro lado, os autores ponderam que, recentemente, tem se verificado que certos níveis de citocininas no MAR devem ocorrer, pois interferem na regulação dos genes PIN, afetando o efluxo local das auxinas e favorecendo a proliferação de raízes laterais. Cabe destacar também que, o nível de auxinas na base da estaca durante o período de enraizamento pode proporcionar um processo de desdiferenciação celular, que precede a formação do primórdio radicial (Haissig, 1973). Posteriormente, a partir da divisão de células adjacentes surgem os primórdios radiciais. Em determinadas condições, estacas lenhosas após a forçagem apresentam um acúmulo de células não diferenciadas na região basal, que podem estar associadas ou não com a presença futura de raízes (Dias, 2009).

Além da relação entre auxinas e citocininas no processo de ontogenia da muda, Nanda e Melnyk (2018) destacam também o envolvimento de mais outros grupos de fitohormônios neste processo, destacando-se: ácido abscísico, etileno, giberelinas, ácido jasmônico e brasinosteróides. De maneira geral, a interação entre fitohormônios é regulada por processos antagonísticos e sinérgicos. Assim, para que o balanço entre auxinas e citocininas seja equilibrado, a interação com estes fitohormônios deve ser finamente ajustada.

O ácido abscísico (ABA) é um fitohormônio relacionado às múltiplas respostas das plantas aos estresses bióticos (ex.: doenças fúngicas, vírus, bactérias, herbivoria) e abióticos (ex.: seca, maturação, dormência de gemas, germinação de sementes e abertura estomática) (Nanda e Melnyk, 2018). Outro efeito do ABA no processo de enxertia é a sinalização ao corte, na coleta dos sarmentos e na enxertia, pois representa uma resposta das plantas ao ferimento.

Neste caso, o ABA se acumula no local do corte, induzindo a expressão de genes associados às respostas de defesa (Gijsegem *et al.*, 2017). Alguns destes genes são relacionados ao metabolismo de estresse oxidativo, pois na primeira linha de defesa da planta ocorre o aumento das EROS e a diminuição dos antioxidantes (em especial as peroxidases da classe III). Em videiras, este fato foi confirmado ao identificarem na região da enxertia a expressão do *SAG101*, relacionado a morte celular programada (Cookson *et al.*, 2013). Além disso, o acúmulo de ABA atua como um repressor nas rotas de biossíntese das auxinas e citocininas (Noriega e Pérez, 2017), afetando negativamente o processo de formação da muda. Essa interferência ocorre principalmente na inibição do fator de transcrição ABI4, que é normalmente induzido pelas citocininas e que regula a polaridade de PIN1. Como consequência, o fluxo basípeto da auxina é reduzido, prejudicando tanto a calogênese, na região da enxertia, quanto a rizogênese, na base do porta-enxerto. Os níveis endógenos de ABA também bloqueiam a superação da dormência e, conseqüentemente, a brotação do enxerto. De modo geral, o ABA pode promover muitos efeitos antagônicos durante a etapa de enxertia e formação da muda, sendo o nível desta interferência diretamente associado ao histórico fitossanitário e fisiológico das plantas matrizes e das condições de coleta e armazenamento do material propagativo. Finalmente, cabe destacar que, temporalmente na ontogenia da enxertia, sua interação com auxinas e citocininas inicia de forma mais intensa quando as estacas são submetidas à indução da brotação na etapa de forçagem. Noriega e Pérez (2017) ao exporem estacas de videira dormentes a temperaturas em torno de 23°C verificaram a diminuição na expressão do gene *VvNCED1*, responsável pela biossíntese de ABA ao longo do tempo. De forma contrária, houve alta expressão dos genes de transporte de auxinas (*VvPIN3*), sugerindo a desrepressão destes a partir da repressão do ABA. Ao final da terceira semana, ocorreram os menores níveis de ABA e o aumento da biossíntese de auxina e citocinina, coincidindo com o início da brotação.

O etileno é um fitohormônio envolvido na regulação de inúmeros processos fisiológicos, incluindo: senescência foliar, iniciação radicial e resposta aos estresses bióticos e abióticos (Nanda e Melnyk, 2018). Este hormônio atua em conjunto com o ABA na sinalização de respostas a ferimentos e na indução da senescência foliar. Porém, de forma contrária, apresenta um efeito positivo

sobre o metabolismo de auxinas, induzindo a biossíntese através da ativação dos fatores de transcrição WUSHEL e na expressão de *ANAC071* (Nanda e Melnyk, 2018). Portanto, o corte da enxertia sinaliza para acúmulo de etileno na região do ferimento, favorecendo a calogênese pelo efeito aditivo sobre auxina. Além disso, o próprio etileno atua na divisão de células dos feixes vasculares, através da ativação de genes *TDR* e *TDI*. De forma complementar, Yin *et al.* (2012) consideram que a presença de etileno e ácido jasmônico precedem a sinalização das auxinas, respondendo ao estímulo do ferimento e então desencadeando a cascata de ativação gênica que resulta no acúmulo de auxinas. Apesar destas vantagens, o excesso de etileno nos tecidos também pode ser prejudicial. Segundo Pereira *et al.* (2014), o excesso de auxinas nas raízes pode favorecer o aumento na produção de etileno na região basal da muda e, como consequência, ocorre um processo de degradação e deterioração das raízes e inibição na produção de citocinina. Quanto a regulação da senescência foliar, o etileno ativa o processo a partir do momento em que as folhas atingem seu estágio maturidade, resultando na abscisão foliar (Iqbal *et al.*, 2017). Etileno e ABA, em conjunto com metiljasmonato, regulam de forma cruzada e sinérgica o processo metabólico da senescência foliar, porém ativados por diferentes estímulos (Kim *et al.*, 2011). Durante a senescência, tanto etileno quanto ABA atuam reprimindo os fitohormônios promotores de crescimento, especialmente as auxinas (Iqbal *et al.*, 2017). A diferença entre os fitohormônios é que, no caso de etileno, aplicações exógenas de citocininas podem reverter a fase de degradação das clorofilas (Iqbal *et al.*, 2017) enquanto que, o controle por ABA, só é reversível a partir de suprimento por frio.

Os ácidos giberélicos (GA's) são fitohormônios de ampla atuação fisiológica, envolvidos na divisão, diferenciação e proliferação celular (Nanda e Melnyk, 2018). Durante a enxertia, as GA's estão relacionadas especialmente com a proliferação do tecido cambial pós-expansão meristemática. Todric *et al.* (2005) obtiveram ganhos no enraizamento de porta-enxertos de videiras a partir da utilização sequencial de GA₃ durante o período de enraizamento de mudas no viveiro. Por outro lado, conforme os autores, com a aplicação de inibidores deste fitohormônio (como paclobutrazol) favoreceu-se a antecipação da maturação dos sarmentos e o acúmulo de reservas (amido), mas com consequências negativas sobre a biomassa de raízes. Tal fato pode estar

associado à relação antagonística entre os efeitos de GA's e citocininas, determinante no processo de desenvolvimento vegetal. Em brotos de tomate, Cato *et al.* (2013) verificaram que aplicações de GA's estimularam a alongação foliar, porém, ao adicionar citocininas, inibiu-se este efeito, promovendo redução no tamanho dos entrenós e na área foliar das plantas. Já em videiras, durante a superação do estado de dormência e início da brotação (que corresponde também o período inicial de brotação do enxerto na formação da muda), tem sido destacado um efeito inibitório das GA's sobre o estímulo à brotação (Zheng *et al.*, 2018). Segundo estes autores, altos níveis de GA₃ acumulados na etapa de endodormência reprimem uma série de genes associados ao SAM, cuja diferenciação meristemática é estabelecida pelas citocininas.

O ácido jasmônico (AJ) tem sido associado aos primeiros momentos de ativação metabólica prévia da calogênese, na região do corte da enxertia, como a expressão de genes (RAP2.6L), tendo sua ativação durante o estresse biótico e abiótico, incluindo o ferimento do corte da enxertia (Nanda e Melnyk, 2018). Conforme os autores, recentes estudos têm indicado que existe um efeito antagonístico do AJ sobre as citocininas, induzindo maior formação de xilema. Por outro lado, AJ e auxinas tem vias de sinalização cruzada na regulação da divisão celular durante a reunião de tecidos. Esta interação se dá especialmente durante o desenvolvimento radicial, manutenção da estrutura do MAR e transporte de auxinas. Apesar destas relações básicas a dinâmica do AJ durante a enxertia ainda permanece obscura.

Os brassinosteróides (BR's) são outro grupo de fitohormônios de ampla atuação, agindo sobre processos da divisão celular e morfogênese (Nanda e Melnyk, 2018). Conforme os autores seu efeito básico dá-se sobre a promoção da formação do xilema, em especial a diferenciação de traqueídeos e formação do xilema secundário. Da mesma forma que o AJ, ainda carece de maior aprofundamento investigativo seus efeitos durante a enxertia. Mas sabe-se que durante a enxertia da videira, muitos genes relacionados a esta categoria fitohormonal são superexpressos, indicando interação com receptores de defesa da planta em resposta ao estresse (Cookson *et al.*, 2013). Também, a interação de BR com outros hormônios foi recentemente detalhada em fruteiras de clima temperado por Zheng *et al.* (2019). Em plantas de maçã, os autores verificaram que o aumento dos níveis de BR's, refletiu-se na maior biossíntese e transporte

de auxinas e giberelinas. Também, a interação sinérgica entre estes três fitohormônios promovem a regulação do crescimento celular, basicamente pela superexpressão de genes relacionados à proliferação, divisão e alongação celular.

O ácido salicílico (AS) é um fitohormônio fenólico envolvido nos processos de defesa das plantas relacionado com expressão dos genes de resistência, acumulado no local da infecção patogênica (Malamy *et al.*, 1990). Quanto ao seu envolvimento ao longo da ontogenia da enxertia, seu envolvimento tem sido pouco estudado. Mas avanço tem sido observado em videiras por Orrantia-Araujo *et al.* (2020), demonstrando uma estreita relação entre os níveis de ácido salicílico nas plantas com a taxa de brotação das gemas na saída do período de dormência. Conforme os autores o acúmulo de frio estimula sinaliza a expressão dos genes relacionados a síntese de AS. Sob exposição ao calor, os níveis de AS mostraram-se correlacionados com a taxa de brotação das gemas. Outro o efeito do AS que pode afetar a formação das mudas, refere-se a sua atuação no bloqueio da atividade da catalase, resultando em elevação dos níveis de H₂O₂ (Klessig e Malamy, 1994). O H₂O₂ é conhecido como um mensageiro secundário que participa na ativação dos genes relacionados à defesa das plantas, dentre estes, aqueles relacionados à queima oxidativa, que ocorre minutos após a infecção patogênica. A queima oxidativa leva a desnaturação das proteínas da parede celular como forma de inibir a expansão do patógeno. No caso da enxertia, aumento dos níveis de H₂O₂ estão associados ao chamado “escurecimento enzimático” ou formação de “placas necróticas” na região de interface entre enxerto e porta-enxerto, podendo ser um dos indicativos de má cicatrização da enxertia (Wang e Kollmann, 1995).

2.3.4 Efeito de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e apresentam uma grande diversidade de funções (Errea, 1998). Dentre os mecanismos de ação, os fenóis podem atuar de modo direto ou indireto estimulando, degradando ou sintetizando outros subprodutos (ex.: fitohormônios). A biossíntese destes fenóis, em parte, está muito associada aos mecanismos de defesa dos tecidos em relação aos diferentes tipos de estresse, como o processo de enxertia. Portanto, isso explica o intenso acúmulo de

compostos fenólicos que ocorre durante o período inicial da enxertia (Canas *et al.*, 2015). Este acúmulo pode afetar de modo positivo ou negativo, tanto a calogênese quanto a diferenciação dos vasos do xilema e floema. Quando o efeito for negativo, dependendo do tipo e a concentração do fenol, ocorre a interrupção do desenvolvimento celular e, conseqüentemente, as reações de incompatibilidade (Baron *et al.*, 2019).

Durante a ontogenia da enxertia, há uma elevada interação entre os fenóis e os fitohormônios, especialmente na regulação dos níveis de AIA. Este controle ocorre por oxidação e é determinado pelo efeito dos fenóis sobre a formação das EROS, que favorecem a atividade da enzima AIA-Oxidase. Existem fenóis que induzem e outros que reprimem esta reação. De modo geral, os monofenóis promovem esta reação, reduzindo os níveis de AIA, enquanto que os difenóis reprimem (Lee *et al.*, 1982). De forma mais específica, o ácido cumárico (precursor das ligninas) e o ácido hidroxibenzênico são os monofenóis que exercem maior atividade da enzima AIA-oxidase, reduzindo a oferta de auxina. Por outro lado, os polifenóis (como o ácido cafeico, o-fenóis e p-difenóis) exercem função protetora sobre o AIA, mantendo o meio celular em estado reduzido e, conseqüentemente, inibindo esta reação de oxidação (Lee *et al.*, 1982; Baron *et al.*, 2019).

Além dos efeitos sobre a atividade da AIA-oxidase, os compostos fenólicos podem afetar outras vias hormonais em situações de estresse. Os flavonóides, por exemplo, interagem com PIN2 inibindo sua distribuição na membrana celular e prejudicando o transporte basipetal de auxinas (Buer *et al.*, 2010). Gainza *et al.* (2015) revelam que o acúmulo de flavonóides ocorre ainda nas fases iniciais da enxertia, havendo danos à diferenciação do calo. Os flavonóides mais relacionados a este dano são as prunasinas, identificadas em espécies de *Prunus* (Pereira *et al.*, 2014), e a epicatequina, em espécies de *Vitis* (Canas *et al.*, 2015).

Outra característica marcante determinada pelos compostos fenólicos e que afeta a formação da muda, refere-se aos seus efeitos no processo de lignificação. A partir deste processo, a parede secundária se estabelece e os tecidos irão apresentar rigidez mecânica (Taiz e Zeiger, 2009) proporcionando resistência estrutural a muda. Além disso, os fenóis também atuam como parte do mecanismo de defesa, evitando a incidência e ataque de patógenos durante

a formação da muda (Rodrigues *et al.*, 2002). Contudo, quando estes compostos são produzidos em excesso haverá falhas de conexões vasculares, prejudicando o transporte de substâncias entre enxerto e porta-enxerto (Herrero, 1951).

A peroxidase é a enzima determinante no processo de lignificação (através da rota dos fenilpropanóides). Na medida em que as subunidades de lignina vão sendo acumuladas na parede primária, elas são oxidadas pela atividade de peroxidases e lacases (acoplamento oxidativo), removendo água da matriz (tornando-se hidrofóbica) e elevando a rigidez, resultando na parede secundária (Taiz e Zeiger, 2009). Durante o processo de calogênese a atividade da peroxidase aumenta no tempo, acumulando-se especialmente na região de interface entre enxerto e porta-enxerto, onde estão sendo formados os novos tecidos vasculares (Fernandez-Garcia *et al.*, 2004). Sua atividade é mediada pela presença de compostos fenólicos (especialmente o ácido cinâmico e o ferúlico) que são utilizados como substratos orgânicos para doação do peróxido de hidrogênio, que é utilizado na constituição da lignina (Gaspar *et al.*, 1982). Quando ácido cinâmico e o ferúlico ocorrem em altas taxas durante a enxertia, o processo de peroxidação se torna intenso, produzindo H_2O_2 em níveis tóxicos, levando ao “escurecimento enzimático”. Em mudas de coníferas, Copes (1969) verificou que uma lignificação normal da enxertia tem início em torno de 14 dias após a união, sendo completada após 35 dias. Contudo, quando ocorre uma lignificação excessiva pelo acúmulo de ligninas, este período se prolongou por até três meses após a enxertia. Neste caso, é comum a visualização de certos indicadores fitotécnicos de incompatibilidade nas plantas, como a formação de rachaduras na região da enxertia, assimetrias de diâmetro do enxerto em relação ao porta-enxerto ou engrossamento excessivo no ponto de enxertia (Herrero, 1951). Adicionalmente, o excesso de H_2O_2 induzido pela lignificação também pode causar uma fraca calogênese, pois esta ERO atua como cofator no catabolismo da auxina livre (via AIA-oxidase), restringindo a divisão celular (Gebhardt, 1982), o que favorece mudas com ponto de enxertia frágil e quebradiço.

2.3.5 Efeito da combinação genética entre enxerto e porta-enxerto

Nas diversas culturas frutíferas o fator determinante para a formação de uma muda funcional é a combinação genética enxerto/porta-enxerto (Köse et

al., 2015). No caso da videira, historicamente ocorrem baixos índices de incompatibilidade natural, haja vista que, a maior parte das combinações é intra-espécies (May, 1994). Contudo, atualmente tem ocorrido um contínuo lançamento de novos porta-enxertos com cruzamentos genéticos distintos dos tradicionais híbridos americanos, fontes iniciais de resistência à filoxera (Granett *et al.*, 2001). Apesar deste cenário, o nível de incompatibilidade entre as inúmeras combinações de enxerto e porta-enxertos em videiras continua sendo pouco estudado ou abordado de modo superficial. Em geral, nestas novas combinações estão sendo considerados para seu desenvolvimento, apenas alguns indicadores fitotécnicos gerais, como a facilidade de enraizamento de porta-enxertos ou vigor que estes expressam sobre a cultivar-copa.

Para minimizar os riscos de incompatibilidade torna-se importante conhecer as respostas das combinações genéticas locais e ajustar protocolos específicos para produção de mudas em cada combinação. Nas condições do Sul do Brasil, existe um uso expressivo de cultivares-copa provenientes de programas de melhoramento americanos ('Isabel', 'Niágara Rosada' e 'Bordô') combinadas com porta-enxertos provenientes de programas de melhoramento brasileiros ('IAC 572' e 'IAC 766'), europeus ('SO4' e 'Paulsen 1103') e americanos ('VR043-43'). Estas combinações são únicas dentre as demais regiões vitícolas mundiais (Protas e Camargo, 2011). Portanto, carecem de protocolos específicos, incluindo uma caracterização prévia de brotação, calogênese e enraizamento.

No que se refere a brotação, como já apresentado anteriormente, envolve um mecanismo poligênico de regulação da endodormência, coordenado principalmente pelo acúmulo de frio hibernar (Hawerroth, 2010). Portanto, quanto a exigência de frio para superar a endodormência, os genótipos de clima temperado podem ser classificados em três níveis: leves, intermediários e profundos (Melke, 2015). Por exemplo, no Sul do Brasil, Anzanello *et al.* (2018) observaram que para a indução e superação completa da endodormência de cultivares precoce (Chardonnay), intermediária (Merlot) e tardia (Cabernet Sauvignon) foi necessário, respectivamente, um total de 136 horas-frio (HF), 298 HF e 392 HF. Portanto, se essas diferenças não são consideradas entre anos, datas de coletas e tempos de armazenagem, podem ocorrer respostas distintas na formação e qualidade da muda. Atualmente, em viveiros nacionais, é comum

que as enxertias sejam realizadas imediatamente após as coletas das estacas nas plantas matrizes por ocasião do final do período hibernar. Contudo, em muitos anos, pode não ter ocorrido o somatório de frio que atenda preliminarmente as exigências de cada genótipo, resultando em brotações tardias e irregulares sob condição de forçagem (Or *et al.*, 2000).

A calogênese também é altamente afetada pela distância genômica entre o enxerto e o porta-enxerto, tanto do ponto de vista morfológico (anatomia vascular) quanto bioquímico (fenóis, enzimas e fitohormônios). Conforme Kösea *et al.* (2015), no que se refere a morfologia, quanto maior a distância, menor será a chance de ocorrerem conexões vasculares completas durante a forçagem. Homoenxertos tendem a favorecer a calogênese, enquanto que heteroenxertos (provenientes principalmente de enxertias inter- ou intra- gêneros/famílias) tendem a apresentar incompatibilidade natural. Além disso, mesmo dentro de uma mesma espécie, o padrão de vascularização varia com a combinação de cultivares (Santarosa *et al.*, 2016). As diferenças entre genótipos influenciam principalmente no alinhamento cambial e vascular entre a cultivar-copa e o porta-enxerto, afetando a qualidade da calogênese e aumentando os riscos de incompatibilidade e má formação de mudas (Vahdati *et al.*, 2010).

Quanto aos aspectos bioquímicos, Assunção *et al.* (2019) destacam o efeito dos níveis endógenos dos compostos fenólicos sintetizados na região da enxertia de videiras, a partir de diferentes combinações enxerto/porta-enxerto. No geral, nas combinações de genótipos considerados menos compatíveis ocorreram as maiores concentrações de ácido gálico, ácido sináptico e catequina (flavonóides) nesta região. Este aumento na concentração de flavonóides, induz a diminuição da taxa de transporte polar das auxinas (Buer *et al.*, 2010) e, por consequência, causa uma redução no potencial de calogênese na zona de enxertia ou de enraizamento na base das estacas.

Também, a expressão de certas enzimas é outro exemplo de variações no aspecto bioquímico que pode ocorrer, conforme a combinação de genótipos utilizada na enxertia. A exemplo disso, Rodrigues *et al.* (2002) encontraram diferenças significativas no nível de atividade de peroxidase entre diferentes porta-enxertos de *Prunus*. Aqueles genótipos com maior atividade também apresentaram um histórico de alta incompatibilidade. Essa incompatibilidade associada ao desbalanço da peroxidase pode ser explicada pela consequente

lignificação anormal e deficiência de conexões vasculares que as piores combinações apresentaram.

Recentemente, os níveis endógenos de fitohormônios entre diferentes combinações enxerto e porta-enxerto também têm sido relacionados à incompatibilidade. Em testes com variedades de *Citrus* tradicionalmente consideradas compatíveis e incompatíveis, He *et al.* (2018) verificaram que, apesar da semelhança anatômica, todas as combinações compatíveis apresentaram maior concentração de AIA. Além disso, porta-enxertos com diferentes níveis hormonais afetam fisiologicamente a resposta da cultivar-copa (Cookson *et al.*, 2013) como o controle do crescimento do enxerto e sua atividade reprodutiva (Gregory *et al.*, 2013). Em videiras, durante a evolução da enxertia, há uma troca dinâmica de sinais entre enxerto e porta-enxerto, incluindo-se os genes Aux/IAA e ARF, responsáveis pela biossíntese do AIA (Corso *et al.*, 2016).

O enraizamento de videiras, também é altamente influenciado pela origem genética do porta-enxerto utilizado, podendo ser resultado de diferenças bioquímicas entre genótipos. Por exemplo, a elevada concentração de certos compostos fenólicos, tais como ácido gálico e (+)-catequina, tem sido associada a problemas de diferenciação de novos tecidos, formação de câmbio e, conseqüentemente, menor capacidade de enraizamento de certos porta-enxertos de videiras (Canas *et al.*, 2015). Neste caso, a muda pode apresentar calogênese e brotação, mas não se torna funcional pela carência ou ausência de raízes. Muitas vezes é a interação entre os fatores anatômicos e bioquímicos quem determina a capacidade de enraizamento dos diferentes genótipos de porta-enxertos. Conforme Mayer *et al.* (2006), em genótipo de *Vitis rotundifolia*, as características anatômicas e a concentração de compostos fenólicos nos raios secundários do floema, foram consideradas como fatores que restringem suas raízes adventícias laterais. Já a superação das limitações da propagação, quando possível, é específica para cada cultivar. O 'VR043-43' (híbrido de *Vitis rotundifolia* X *Vitis vinifera*), por exemplo, historicamente apresenta baixos índices de enraizamento natural em estacas lenhosas (Botelho *et al.*, 2009). Em geral, neste caso, a aplicação de ferimento na base das estacas, seguida por rápida imersão em elevada dose de AIB é a recomendação para indução parcial do enraizamento (Bettoni, 2014).

2.4 Estratégias para o aumento da qualidade de mudas

A partir da adoção de certas práticas fitotécnicas no viveiro, muitos dos fatores fisiológicos que afetam negativamente a formação das mudas pode ser superada ou minimizada. Conforme Hunter *et al.* (2013), diversos fatores de manejo estão relacionados à enxertia anormal e, conseqüentemente, mudas de baixa qualidade. Estes fatores ocorrem tanto ao longo do desenvolvimento das plantas matrizes no jardim clonal, quanto ao longo da enxertia e o enraizamento da muda. Nestes momentos, destacam-se principalmente a etapa de manejo das plantas matrizes e o período de retirada das mudas da câmara de forçagem, os quais concentram os maiores riscos ou impactos na qualidade final da muda. O sistema de enxertia de mesa apresenta uma série de recomendações ao longo destas etapas, cujo protocolo básico está bem definido, inclusive no Brasil (Regina, 2002a; Kuhn *et al.*, 2007). Contudo, Gramaje e Dimarco (2015) destacaram em um levantamento de 15 países da Europa que há uma elevada variabilidade entre viveiros quanto aos métodos aplicados no sistema de enxertia de mesa. Os contrastes de métodos ocorrem principalmente em função da interação que as combinações enxerto/porta-enxerto apresentam com o ambiente de produção, determinando assim, distintos níveis de qualidade de mudas entre anos e regiões.

2.4.1 Época de coleta do material vegetal em jardim clonal

A coleta do material propagativo nas plantas matrizes tem sido considerada pelos viveiristas como o momento de definição do calendário de produção no ano. De forma geral, nas condições do Sul do Brasil ele é fixo, ocorrendo todos os anos desde a metade de agosto até o início de setembro (Biasi *et al.*, 2010). De forma complementar Kuhn (2003) indica que viveiristas da região da Serra Gaúcha, tradicionalmente, realizam esta coleta no final do inverno (visando o máximo acúmulo de horas de frio a campo). Ou seja, como prática, a coleta do material vegetal das cultivares-copa ocorre sempre quando as plantas já estão na iminência de atingir a brotação, sendo a enxertia realizada imediatamente após a coleta.

No Rio Grande do Sul, Berlato e Cordeiro (2018), comparando duas normais climatológicas, destacam as tendências de aumento da temperatura mínima e de aumento do número de noites quentes, principalmente no outono e

no verão. Também, conforme Junges (2018), na região da Serra Gaúcha, de maio a setembro é o período que ocorre a maior variabilidade interanual de temperaturas. Neste caso, anos com oscilações térmicas no período hibernar, também causam impactos negativos sobre a uniformidade e a capacidade total de brotação de gemas nos genótipos de clima temperado, pois temperaturas elevadas durante os períodos de frio anulam o efeito das HF acumuladas (Anzanello *et al.*, 2014). Diante disso, o viveirista que esperar apenas pelo acúmulo de frio natural para a coleta, em muitos anos poderá ser surpreendido pela grande desuniformidade na capacidade de brotação e na qualidade de enxertia durante a formação da muda.

Além dos aspectos apontados acima, destaca-se ainda que as projeções climáticas futuras possam desfavorecer ainda mais a estratégia atual adotada pelos viveiristas. Conforme Berlato e Cordeiro (2018) para o sudeste da América do Sul, principalmente a região que inclui o extremo Sul do Brasil, as projeções climáticas indicam aumentos amenos da temperatura, em um cenário otimista em dois marcos de tempo (2046-2065 e 2081-2100). Ainda conforme estes autores, amplitude térmica diária, ondas de frio e dias de geadas severas estão diminuindo significativamente. Portanto, ajustes fitotécnicos que permitam ao viveirista depender menos de condições ótimas de acúmulo de frio a campo para a realização da coleta em plantas matrizes, são vistas como essenciais na sustentabilidade do sistema de produção de mudas Sulbrasileiro.

Um destes ajustes é a armazenagem refrigerada do material propagativo em câmara com temperatura controlada. Este armazenamento interfere nas respostas de calogênese, brotação e enraizamento da videira (Alley e Peterson, 1977). Quando empregado na quantidade certa, a exposição do material ao frio artificial pode ser benéfica. Porém, para que o efeito esperado ocorra, a definição da época de coleta do material vegetal é decisiva, pois se sabe que ao longo do período da dormência ocorre uma evolução temporal das concentrações dos elementos repressores x indutores da brotação (Hawerth *et al.*, 2010). Assim, a sincronia entre a época de coleta e o tempo de armazenagem refrigerada é a base para viabilidade deste ajuste fitotécnico.

2.4.2 Tempo de armazenamento de estacas em câmara frigorífica

O armazenamento de estacas em câmara frigorífica se apresenta como uma alternativa para obter condições fisiológicas uniformes e ótimas. Adicionalmente, também permite conciliar a época de coleta com o período mais favorável de plantio. Isto se torna relevante, pois nas condições do Sul do Brasil a recomendação para o plantio de mudas, na sua maior parte, é entre os meses de agosto e outubro (BRASIL, 2019). Plantios muito precoces de mudas, anteriores a agosto, correm um risco muito alto de perdas das novas brotações por geadas tardias no final do inverno e início da primavera. Por outro lado, nos plantios tardios, após outubro, as temperaturas mais elevadas também se apresentam como um risco de perda, em função da incompatibilidade entre a demanda hídrica atmosférica e o desenvolvimento radicial incipiente. Novamente, para que ocorra este benefício operacional, a sincronia do tempo de exposição ao frio artificial com a época de coleta se torna relevante.

No ambiente refrigerado, as menores temperaturas do ar, fazem os níveis de ABA aumentarem rapidamente, pois a planta protege suas estruturas contra o congelamento (Rooy *et al.*, 2017). Benefícios sobre a brotação em videiras foram reportados por Koussa *et al.* (1994), em estacas de 'Merlot', após 32 dias de armazenamento à 2°C seguido de forçagem à 20°C, quando obtiveram 100% de brotação. Porém, o tempo de exposição ao frio e as respostas fisiológicas que ocorrem são altamente dependentes das demandas de cada cultivar (Anzanello *et al.*, 2018). Essas respostas não são apenas em brotação, mas em toda capacidade metabólica das estacas. Em diferentes cultivares de porta-enxertos de videira, Pimentel Junior *et al.* (2018) obtiveram maiores percentuais de enraizamentos após 20 dias de exposição ao frio constante (5°C), quando comparadas aquelas estacas vegetais plantadas imediatamente após coleta em julho. Por outro lado, Alley e Koyama (1981) mantiveram estacas de diversas cultivares de videiras armazenadas por um ano após a coleta, mas sem obter diferenças de enraizamento quando comparado ao plantio sem exposição ao frio. Apesar disso, comprovou-se que existe a possibilidade de garantia da formação da muda, mesmo após armazenagem prolongada sob frio artificial, o que traz grandes vantagens do ponto de vista da definição de épocas de coleta.

Outro fator importante no armazenamento do material propagativo que deve ser considerado juntamente ao tempo refere-se a faixa de temperatura que

será utilizada. Temperaturas abaixo de 1°C causam danos diretos às estacas, em função do risco de congelamento da água endógena; enquanto flutuações acima de 2°C podem interferir na fisiologia da estaca e comprometer a qualidade da enxertia (Waite *et al.*, 2015). Além disso, temperaturas acima de 4°C podem favorecer danos bióticos (ex.: por fungos ou bactérias) ou danos fisiológicos, dependendo do tempo de exposição, pois elevam a atividade metabólica (consumo de oxigênio) e as condições para fermentação, formando subprodutos que comprometem a viabilidade das estacas.

2.4.3 Uso do etefon nas plantas matrizes do jardim clonal

A possibilidade de utilizar a coleta antecipada em associação ao armazenamento em câmara frigorífica permite ao viveirista uma otimização da sua capacidade operacional. Nas condições do Sul do Brasil, as coletas antecipadas de estacas de 'Bordô' e 'Paulsen1103', ainda em maio (antecedendo o período de endodormência), apresentaram valores satisfatórios de sobrevivência de mudas pós-enxertia (Maroli *et al.*, 2014). Contudo, nestas coletas precoces, frequentemente ocorre a presença de folhas ativas nas plantas matrizes de determinadas cultivares. Conforme Mandelli *et al.* (2003), o período de queda natural de folhas na Serra Gaúcha se estende desde 15 de maio, para variedades precoces, até 15 de junho, para as tardias.

A presença de folhas no momento das coletas, além de diminuir a eficiência operacional do processo, conforme Sun *et al.* (2016) se apresenta como um indicativo de que a planta ainda não atingiu sua condição fisiológica ideal de maturidade e ativação do estado de dormência. Ou seja, estratégias para desfolha artificial devem estar sincronizadas com esta queda natural das folhas. Desfolhas precoces, incluído por causas bióticas (ex.: fungos de final de ciclo) e/ou abióticas (ex.: deficiência hídrica provoca por períodos de secas) tendem a ser problemáticas para o acúmulo de reservas do material propagativo. Em videiras, considera-se que um valor mínimo de 13% de carboidratos nas estacas é suficiente para um bom desenvolvimento da muda (Zanathy *et al.*, 1996). Assim, além da forma com que desfolha artificial será realizada, a época em que o manejo será efetuado deve ser considerada para definição de um possível protocolo de coleta antecipada de material propagativo.

No que se refere a forma de desfolha artificial das plantas matrizes, o manejo com etileno surge como alternativa. Este fitohormônio está intimamente relacionado aos processos de senescência e queda natural das folhas (Iqbal *et al.*, 2017). O etileno também atua como um fator endógeno prioritário na regulação positiva da tolerância de videiras ao frio, através do fator de transcrição *VaERF057* (Sun *et al.*, 2016). Este fator regula a expressão de uma série de genes relacionados com a tolerância ao frio, como das enzimas do metabolismo oxidativo superóxido dismutase, peroxidase e catalase. Os níveis endógenos do etileno estão associados às temperaturas do ar no outono, quando inicia o período da dormência. Quanto mais rápida for a queda da temperatura maior será o acúmulo do etileno na planta e, conseqüentemente, maior será a velocidade na queda das folhas. Por outro lado, com temperaturas amenas no início do inverno o processo de abscisão foliar ocorre de forma parcial (Sun *et al.*, 2016; Iqbal *et al.*, 2017).

Atualmente, em videiras, já existe a possibilidade de aumento dos níveis endógenos de etileno a partir da utilização exógena do seu precursor, o etefon (ácido 2-cloroetilfosfônico). A eficiência do etefon é determinada pelo pH do meio celular, temperatura ambiente e resposta genética da cultivar alvo (Lavee, 1984). Após a aplicação, sua distribuição se concentra na região da epiderme e células adjacentes, determinando a obrigatoriedade de um pleno contato foliar do produto na pulverização. Na viticultura tropical a utilização do etefon é indispensável, devido à ausência de frio (sem uma estação de inverno definida) e a conseqüente incapacidade das plantas entrarem no estado de dormência de forma natural. Este produto induz artificialmente a desfolha e uma paralisação temporária do crescimento, mimetizando um estado de dormência em plantas que se apresentam com crescimento vegetativo pleno e ininterrupto nas condições tropicais (Camargo, 2004). Como consequência deste efeito, é possível estabelecer os ciclos de produção, favorecendo o manejo de poda e a organização do dossel produtivo. O etefon também tem sido relacionado com o aumento do potencial de brotação das gemas nos ciclos posteriores (Schenato *et al.*, 2007). Este incremento na brotação é reportado como um dos fatores responsáveis pela maior produção das plantas sob utilização deste insumo (Pereira e Fracaro, 2004).

Recentemente, o etefon também tem sido testado como uma estratégia para antecipação da colheita de material propagativo na produção de mudas em viveiros. Em macieira, Macedo *et al.* (2018) obtiveram ramos com máxima desfolha e uniformidade de maturação dos tecidos, favorecendo a colheita, mas sem registros de modificações sobre a qualidade fitotécnica das mudas. Contudo, a aplicação deste insumo com a finalidade de viabilizar a coleta precoce de material propagativo em matrizeiros de videiras ainda não foi explorada. Diante desta possibilidade, deve-se considerar a interação do etileno com outros fitohormônios no processo de formação da muda, especialmente aqueles diretamente relacionados à calogênese como auxinas e citocininas.

2.4.4 Uso de reguladores de crescimento na formação de mudas em forçagem

Após a coleta e armazenagem do material propagativo, a forçagem é a etapa que mais tem impacto sobre a qualidade da muda em videiras (Hunter *et al.*, 2003). É a fase que condiciona todo potencial fisiológico prévio das estacas de enxerto e porta-enxerto para se obter a plena conexão da enxertia e enraizamento das mudas. Portanto, qualquer variação endógena no perfil hormonal das estacas em favor dos estimulantes (auxina, citocinina, etc) ou repressores (ABA) geram variabilidades na proporção de mudas viáveis e na qualidade fisiológica final destas. Visando o controle destas variações e considerando os benefícios da auxina sobre a cicatrização e vascularização de tecidos (Nanda e Melnyk, 2018), tem sido uma prática comum na enxertia de mesa a utilização de ceras enriquecidas com auxinas (Regina, 2002b; Kuhn *et al.*, 2007). Entretanto, os benefícios destas ceras enriquecidas dependem da interação entre a dose da auxina sintética que dispõem e o perfil endógeno hormonal que o material propagativo apresenta. Por exemplo, quando a auxina é aplicada em altas concentrações há indução da formação dos tecidos de xilema e floema em certos genótipos, enquanto que baixas doses favorecem apenas a formação de tecidos do floema (Aloni, 1980). Por outro lado, o aumento excessivo nas doses pode acarretar em danos fitotóxicos irreversíveis. Isto ocorre, pois, a resposta da planta às doses de auxinas é multigênica, ou seja, diferentes famílias gênicas são codificadas ao longo da rota de transcrição, de modo que, a magnitude da resposta depende do tecido onde a auxina age. Por

exemplo, dependendo da dose aplicada, as auxinas podem promover a expansão celular nos tecidos aéreos em crescimento, mas, ao mesmo tempo, inibir a expansão celular nas raízes (Taiz e Zeiger, 2009).

Outro fato que deve ser considerado na resposta às auxinas é a estrutura química destas que afeta a forma de absorção e transporte através da planta. Ao ser aplicada na planta, a molécula da auxina sintética move-se através das paredes celulares (apoplasto) por difusão simples (Taiz e Zeiger, 2009). Uma vez no apoplasto, as moléculas estão sujeitas ao pH ácido e isso favorece a forma protonada da auxina (AIA-H), o que favorece o influxo para a célula de modo passivo por difusão ou por transportadores pouco específicos (Davies, 2010). Segundo Ender e Streider (2015), apenas os transportadores do efluxo de auxina são específicos. O IBA, por exemplo, tem seu efluxo realizado exclusivamente pela proteína ABCG, que não apresenta efeito sobre AIA. Já o influxo por transportadores não é especializado, sendo que as proteínas AUX1/LAX recebem as moléculas do apoplasto (tanto de auxinas naturais como as sintéticas), carregando-a para o citoplasma da próxima célula. Uma vez dentro da célula, as auxinas sintéticas são convertidas em AIA no peroxisossomo por B-oxidação, sendo a taxa desta conversão dependente da estrutura química da molécula sintética (Taiz e Zeiger, 2009).

A crescente expansão da viticultura para novas regiões, com peculiaridades regionais, trouxe a necessidade de uma revisão quanto a utilização de reguladores de crescimento nesta etapa de forçagem (Iliev *et al.*, 2014; Köse e Gülerüz, 2016). Por exemplo, na Bulgária, com cultivares de videira locais, Iliev *et al.* (2014) obtiveram valores de mudas viáveis de 90% e 66%, com a utilização de ceras comerciais à base de auxinas originadas da França e Espanha, respectivamente. Além disso, tem sido destacado a importância de outras classes de fitohormônios, além das auxinas, que também se relacionam à ontogenia da enxertia. Por exemplo, Köse e Gülerüz (2016) verificaram que a utilização isolada de citocininas (cinetina ou benziladenina) na enxertia de cultivares de origem búlgara proporcionou maior número de plantas viáveis (97%) do que com a aplicação isolada de AIB (18%).

Além dos fitohormônios, novos grupos químicos têm sido também explorados como cofatores para atuarem de forma sinérgica durante a cicatrização da enxertia e, conseqüentemente, favorecer o percentual de mudas

viáveis. Nessa linha, compostos tradicionalmente utilizados nas técnicas de propagação da cultura de tecidos, têm se expandido para aplicações *in vivo* na fitotecnia. Dentre estes, tem se destacado os compostos fenólicos (ex. hidroquinona e floroglucinol) e os antioxidantes (ex. polivinilpirrolidona). De forma geral, os fenóis podem atuar como estímulos para a biossíntese de auxinas ou como substratos alternativos para a enzima AIA-oxidase, restringindo a degradação de AIA (Mierziak *et al.*, 2014). Por exemplo, Goulart *et al.* (2011) obtiveram maiores percentuais de enraizamento em clones de eucalipto a partir do uso combinado de difenóis (hidroquinona e triptofano) com auxina (AIB).

Atualmente, nas condições de produção de mudas no Brasil não se dispõe de uma formulação comercial de cera que atenda plenamente às especificidades locais. Regina *et al.* (2012), comparando ceras comerciais com e sem a presença de auxinas, verificaram ganhos significativos com a utilização da auxina no “pegamento” de mudas de videiras. Porém, a variação deste ganho esteve mais relacionada com o tipo de combinação enxerto/porta-enxerto do que com o tipo de cera testado. Os viveiristas locais têm percebido esta variabilidade de efeito das ceras comerciais e, associado ao custo de importação, acabam não aderindo ao sistema de enxertia de mesa, mantendo-se no tradicional sistema manual por garfagem.

A manutenção da garfagem como sistema de enxertia padrão, além das questões fitossanitárias já apontadas anteriormente elevam o custo unitário da muda pela maior necessidade de mão-de-obra, tempo operacional e baixo rendimento. Conforme Kuhn *et al.* (2007), enquanto que no sistema de enxertia de mesa o rendimento é, em média, de 4.000 mudas homem/dia, no sistema manual fica em torno de 400. Adicionalmente, não foram relatadas no Brasil, iniciativas locais, por instituições públicas ou privadas, que busquem alternativas ao insumo importado, tornando estagnado o cenário de adoção ao sistema de enxertia de mesa no longo prazo.

2.5 Indicadores de formação e qualidade de mudas

Estudos relacionados à qualidade de mudas, com ênfase na ontogenia de enxertia, podem ser conduzidos em diversas linhas. Tradicionalmente, a maior parte dos trabalhos tem foco na anatomia e na morfologia da enxertia, buscando principalmente a caracterização das interações vasculares que ocorrem na fusão

entre enxerto e porta-enxerto (Santarosa *et al.*, 2016). Mais recente, tem se destacado os estudos moleculares com o monitoramento da expressão gênica dos eventos relacionados à enxertia, empregando plantas modelo e abrindo uma nova fronteira nos estudos da incompatibilidade (Nanda e Melnik, 2018).

Apesar da importância e do detalhamento que estes indicadores anatômicos e moleculares proporcionam para o conhecimento científico, tornam-se onerosos e até inviáveis quando se opera em uma escala maior de fatores e interações para o aprimoramento da enxertia. Portanto, neste projeto, foram utilizados indicadores fitotécnicos, embasados por alguns parâmetros bioquímicos e biotecnológicos, para a caracterização da qualidade da muda, envolvendo as etapas de enxertia, brotação e enraizamento, conforme detalhados a seguir.

2.5.1 Indicadores fitotécnicos

Os indicadores fitotécnicos são aqueles analisados de forma expedita, permitindo uma visão descritiva, rápida e muitas vezes não destrutiva do padrão de compatibilidade enxerto/porta-enxerto ou da qualidade final da muda. Goussard (1977) estabeleceu as bases dos indicadores fitotécnicos para caracterização da calogênese em mudas de videira, a partir de uma escala visual que detalha de forma qualitativa e quantitativa sua formação. Diaz *et al.* (2009) incrementaram o conceito desta escala a partir de trabalhos relacionados às doenças de tronco, colocando maior peso na formação do calo na base das estacas como uma barreira de proteção. Além da lista de indicadores básicos, Kösea *et al.* (2015) também destacam a importância de uma caracterização morfológica empregando escores relativos, pois na formação da muda de videira alguns indicadores são mais relevantes do que outros no estabelecimento da qualidade final.

De forma geral, os indicadores fitotécnicos são utilizados para definir padrões ou índices ótimos de qualidade de mudas, mas sem explorar em detalhes a inter-relação entre eles. Por exemplo, Regina (2002b) define que a formação de mudas pós-forçagem é considerada plena, quando há presença de calos de enxertia em 95% das mudas enxertadas. Entretanto, Hunter *et al.* (2003) considera que mudas pós-forçagem de alta qualidade são somente aquelas que apresentam calos de enxertia com espessura entre 2,00 e 3,00 mm de diâmetro.

Ou seja, para a mesma caracterização de qualidade pós-forçagem há dois enfoques diferentes de avaliação e sem considerar as possíveis inter-relações entre eles ou influências de outros fatores (ex. combinação genética, fisiologia do material propagativo, etc).

De modo amplo, na literatura existem inúmeros protocolos para produção de mudas que foram revisados, visando altos índices de qualidade (Regina, 2002a; Hunter *et al.*, 2003; Kuhn, 2003; Kuhn *et al.*, 2007; Gramaje e Armengol, 2011; Waite *et al.*, 2015; Gramaje e Di Marco, 2015; Grohs *et al.*, 2017). Contudo, quando se analisa o efeito de cada recomendação isolada destes protocolos sobre os indicadores fitotécnicos ótimos, os resultados são pouco aprofundados/discutidos ou generalistas. Ou seja, não há um detalhamento na seleção dos fatores que causam benefícios ou restrições sobre a qualidade de cada processo de formação da muda. Este avanço, só é possível a partir de uma amarração destes índices com outros indicadores complementares, como bioquímicos e biotecnológicos. Contudo, até o momento, isso não tem sido considerado (ou explicitado na literatura) nestes ajustes no manejo de produção de mudas de videira.

2.5.2 Indicadores bioquímicos

Com a evolução de protocolos e de equipamentos em estudos bioquímicos nos últimos tempos surgem novas possibilidades ou ferramentas para se caracterizar melhor a interação enxerto/porta-enxerto, prospectando-se, com isso, novos indicadores de qualidade para mudas. A vantagem dos métodos bioquímicos, frente aos tradicionais anatômicos e fitotécnicos, é a sua capacidade de indicar possíveis incompatibilidades ainda nas fases iniciais da produção da muda (Assunção *et al.*, 2016; Assunção *et al.*, 2019). Com essa predição precoce, evitam-se gastos desnecessários, com perdas de campo depois do plantio ou com a manutenção de linhagens com altos níveis de incompatibilidade em programas de melhoramento.

Dentre as ferramentas mais difundidas na atualidade para quantificação de indicadores bioquímicos em mudas enxertadas, destacam-se a eletroforese, a cromatografia e a tomografia (Porika *et al.*, 2016). A cromatografia é uma técnica físico-química para separação dos compostos alvos de uma mistura complexa (Lanças, 2013), como um extrato vegetal. Conforme o autor, o

crescimento deste método de separação em relação aos clássicos (cromatografia em coluna - CC) se deu em função da sua capacidade de análises quantitativas, menor tempo de execução (minutos), alta versatilidade para possibilidade de automação, alta resolução, alta eficiência e maior sensibilidade. A cromatografia é classificada em dois tipos conforme o estado físico da fase móvel usada, podendo ser líquida (LC) ou gás (GC). A técnica do LC evoluiu a partir da utilização de alta pressão para forçar a amostra através da coluna chamando-se cromatografia líquida de elevado desempenho ou cromatografia líquida de alta pressão (HPLC – “*High Performance Liquid Chromatography*”). A utilização do HPLC teve início em 1950 e atualmente é a técnica analítica que mais se desenvolveu em inúmeras áreas científicas e industriais (Nogueira, 2011).

Cabe ressaltar que a detecção é realizada através de sensores que ficam acoplados no final do cromatógrafo. Neste quesito também houve uma série de evoluções ao longo dos anos desde o surgimento dos espectrofotômetros (UV-VIS) até os espectrômetros de massa (MS) (Lanças, 2013). No princípio de funcionamento deste coloca-se carga nas moléculas de interesse (analitos), medindo-se então como as trajetórias dos íons resultantes respondem, sob vácuo, as várias combinações de campos elétricos e magnéticos (Lanças, 2013). Os espectros de massas gerados permitem a detecção seletiva com a confirmação da identidade molecular. Destaca-se ainda que a partir da MS surge a espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Esta considerada de maior sensibilidade e seletividade do que a MS, pois permite a detecção de uma maior quantidade de metabolitos dentro de uma mesma amostra, além da identificação de analitos com características físico-químicas diferentes a níveis de ultratraços (Sawada e Hiraia, 2013).

Cabe destacar que, a eficiência na detecção do composto-alvo dependente da combinação do conjunto acoplado cromatógrafo mais sensor de detecção. De modo geral, GC-MS é utilizada usualmente na análise de misturas complexas de compostos em fase gasosa, limitando a técnica a análise de compostos voláteis e baixa massa molecular. Para compostos de massa molecular maior e/ou maior polaridade e menor volatilidade o LC-MS torna-se a preferência (Arpino, 2006).

Em videiras, trabalhos utilizando cromatografia associada espectrometria na detecção do perfil fitohormonal são clássicos, porém, muitas vezes, limitados a poucos grupos químicos. Por exemplo, Or *et al.* (2000) utilizando GC-MS quantificaram flutuações do ABA em gemas brotadas para caracterização da endodormência. Porém, quando o objetivo é a caracterização do perfil hormonal em mudas de videiras os trabalhos são muito recentes. Esta carência pode ser resultado da dificuldade de extração hormonal em tecidos lenhosos, com baixa concentração dos compostos alvos e grande presença de compostos interferentes, como fenóis (Garighan, 2017). Apesar desta dificuldade, recentemente tem sido ajustado protocolos com HPLC para quantificação endógena de alguns compostos em partes lignificadas de mudas de videira. Por exemplo, Assunção *et al.* (2016) utilizando HPLC-UV/Vis, analisaram diferentes componentes fenólicos em diferentes porções de mudas de videiras pós-forçagem e concluíram que ácidos fenólicos (gálico, ferúvico e sináptico), flavonóides (epicatequina), ácido clorogênico e catequina estão relacionados a processos de incompatibilidade. A aplicação da técnica foi eficiente a ponto de permitir a predição dos níveis da incompatibilidade de enxertia da cultivar Shiraz em diferentes porta-enxertos a partir de certos compostos. Da mesma forma, Zhou *et al.* (2020), quantificaram, também por HPLC-UV/Vis, o conteúdo de ABA, GA₃, AIA e Zeatina Ribosídica presente em diferentes porções de mudas de videiras ao longo do período de forçagem.

Os trabalhos recentes em mudas de videiras com a utilização de HPLC-UV/Vis mostram que é necessária uma quantificação fitohormonal em ampla escala, haja vista que existe grande inter-relação entre os fitohormônios nas diferentes porções do enxerto, enxertia e porta-enxerto frente aos tratamentos aplicados. Para este tipo de análise, o UPLC - "*Ultra Performance Liquid Chromatography*", uma evolução tecnológica do HPLC, apresenta-se como uma opção de menor custo para quantificação de amostras complexas. Em relação a operação do HPLC, o UPLC demanda um menor tempo de análise, necessidade de solventes e quantidade de amostra exigida, o que torna sua utilização promissora para quantificação hormonal. Além disso, quando o UPLC está acoplado a um detector de espectrometria de massa (LC-MS/MS, "*liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*"), o conjunto é altamente seletivo e sensível para detecção e quantificação de metabolitos de

baixa concentração em amostras pequenas (gramas) e complexas (Cui *et al.*, 2015), como fitohormônios. Contudo, concomitante com essa evolução na sensibilidade e capacidade de detecção com LC-MS/MS há um aumento simultâneo na complexidade de uso e aplicação (Sawada e Hiraia, 2013). O protocolo básico para utilização do LC-MS/MS em fruteiras de climas temperado foi ajustado por Garighan (2017). Neste caso, foi utilizado para detecção de ABA, GA₃, GA₄, AIA, AJ, AS e *trans*-Zeatina Ribosídica em gemas dormentes e tecidos pigmentados de macieira, mostrando-se sensível e preciso na quantificação.

Em geral, para se usufruir da máxima performance deste conjunto na detecção de metabólitos em amostras complexas, como extratos de estacas de enxerto e porta-enxerto, torna-se necessário o aprimoramento em rotinas de extração e purificação, para se obter o máximo ganho de detecção/quantificação de fitohormônios nestas amostras lignificadas de videiras. Desta forma, no presente projeto, foram trabalhados ajustes no protocolo UPLC-MS/MS proposto por Garighan (2017). A partir dessas análises, visa-se uma caracterização do perfil hormonal (qualitativo e quantitativo) em mudas de videiras, inter-relacionando os demais índices fitotécnicos de qualidade de mudas.

2.5.3 Indicadores biotecnológicos

Nas técnicas da cultura de tecidos (cultivos *in vitro*) pode-se obter facilmente a formação de calos (calogênese), o que tem uma aplicabilidade grande em estudos biológicos. Os calos são gerados em meios específicos de cultivo e consistem, basicamente, em tecidos aglomerados não diferenciados obtidos a partir de explantes vegetativos (Jonard *et al.*, 1990). Estes mesmos autores definiram (a partir da técnica de formação e cultivo de calos) o protocolo de co-cultivo de calos. Seu objetivo é simular a condição de enxertia *in vivo* (especificamente a etapa da calogênese), a partir da fusão dos calos de duas cultivares ou espécies. O co-cultivo tem sido aplicado tanto em estudos moleculares, no detalhamento dos eventos decorrentes da fusão entre enxerto e porta-enxerto (Liu *et al.*, 2018), como em estudos anatômicos, relacionados à incompatibilidade de enxertia e formação vascular primordial (Pina *et al.*, 2009). Portanto, a análise qualitativa da fusão entre calos pode ser considerada como um indicador biotecnológico da ontogenia de enxertia.

A vantagem da técnica de co-cultivo é que a utilização de calos permite uniformizar a condição fisiológica do material vegetal, obtendo-se resultados mais próximos do efeito genético isolado determinado por cada genótipo (Jonard *et al.*, 1990). Além disso, em um espaço físico reduzido e um curto período de tempo é possível replicar um grande número de tratamentos, facilitando a prospecção de ajustes promissores com menor custo (Matos, 1997). Em contrapartida, em experimentos *in vivo*, como no sistema de enxertia de mesa, o mesmo tipo de experimentação necessitaria da estrutura de um viveiro e uma grande quantidade de material propagativo, o que se torna oneroso em tempo, espaço e mão de obra.

Para que a técnica de co-cultivo seja aplicada com êxito, inicialmente é preciso o ajuste do meio de cultivo para a indução dos calos a serem fusionados. Neste caso, os ajustes de doses e tipos de reguladores de crescimento tornam-se necessário, considerando que a essencialidade destas moléculas na enxertia *in vivo* (Yin *et al.*, 2012). Esses ajustes hormonais são importantes não apenas para o desenvolvimento dos calos em si, mas também para o estímulo inicial de fusão dos calos adjacentes. No conjunto, o protocolo de co-cultivo é definido por uma formulação hormonal ótima (grupos químicos, doses e suas combinações) que possa induzir inicialmente o crescimento e, posteriormente, a fusão dos calos. Por exemplo, na cultivar de videira Chenin blanc (*Vitis vinífera*) Kumsa (2017) obteve elevados índices de formação de calos a partir do uso combinado de 1,5 mg l⁻¹ de BAP com 1,0 mg l⁻¹ de AIB. Entretanto, Feucht *et al.* (1998) obtiveram sucesso no crescimento de calos de 'Spätburgunder' (*Vitis vinífera*), a partir da combinação de 0,2 mg l⁻¹ de BAP com 20,0 mg l⁻¹ de catequina. A partir dos ajustes dessas variações para o crescimento de calos dos genótipos de interesse, o nível de fusão destes será altamente dependente da capacidade de resposta e de interação de cada genótipo (Kumsa, 2017), o que pode favorecer a seleção das combinações enxerto/porta-enxerto mais promissoras. Esta variabilidade genética das respostas ao meio indutor de crescimento tem se apresentado como uma limitação para o amplo uso da técnica de co-cultivo em videiras.

Apesar desta limitação os trabalhos baseados em co-cultivo de calos *in vitro*, são promissores no seu uso como suporte aos estudos *in vivo*. Dentre as possibilidades, destaca-se a predição ampla (grande número possível de

combinações testadas) e preliminar do risco de má formação da enxertia e, conseqüentemente, da incompatibilidade de uma combinação de genótipos. Por exemplo, Errea *et al.* (2001) pré-determinaram a descontinuidade cambial de combinações hetero-enxertos de *Prunus* através de uma análise microscópica durante a fusão de calos *in vitro*. Nas mesmas combinações a campo, estes sintomas de incompatibilidade foram percebidos somente após anos depois do plantio das mudas.

Outra aplicação promissora da utilização da técnica são os ensaios para a prospecção de compostos aditivos para a enxertia e qualidade de mudas. Ao se delinear ensaios *in vivo* a partir de fatoriais completos para esta finalidade, os resultados tendem a retornar em um grande número de interações (Gabrielsson *et al.*, 2002). Para contornar esse problema, os ensaios *in vitro*, em cultura de tecidos, têm se apresentado como uma estratégia mais eficaz, favorecendo a prospecção de aditivos químicos menor demanda de espaço e tempo e alto rendimento analítico (Matos, 1997). Conforme estes autores, esta abordagem tem sido aplicada com êxito na obtenção de fármacos químicos. Assim, a abordagem associando a prospecção de formulações indutoras da fusão de calos *in vitro*, a partir da técnica do co-cultivo, seguido de uma validação *in vivo* das melhores formulações, no sistema de enxertia de mesa, torna-se inovadora na área da fruticultura.

2.6 Referências bibliográficas

ALBUQUERQUE, J. A. S. de; ALBUQUERQUE, T. C. S. de. Dormência de gemas da videira na região do Sub-Médio São Francisco. *In: Simpósio Brasileiro do Trópico Semi-Árido*, 1982, Olinda. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, 1982. p. 2-15.

ALONI, R. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. **Planta**, Bonn, v. 150, p. 255–263, 1980.

ALLEY, C. J. Mechanized grape grafting: portable machine developed for bench or field grafting of grapes saves time and eliminates the need for skilled labor. **California Agriculture**, Richmond, v. 11, n. 6, p. 3-12, 1957.

ALLEY, C. J.; PETERSON, J. E. Grapevine propagation. IX. Effects of temperature, refrigeration, and indole butyric acid on calosing, bud push, and rooting of dormant cuttings. **American Journal Enology and Viticulture**, Davis, v. 28, n. 1, p. 1-7, 1977.

ALLEY, C. J.; KOYAMA, A. T. Rooting and growth of dormant grapevine cuttings. **California Agriculture**, Riverside, v. 35, n. 3-4, p. 18-19, 1981.

ALVES, M. E. *et al.* Evidências de invernos mais curtos em regiões vitivinícolas do Rio Grande do Sul com base na temperatura mínima. **Agrometeoros**, Passo Fundo, v. 27, n. 1, p. 43-52, 2019.

ANZANELLO, R. *et al.* Bud dormancy in apple trees after thermal fluctuations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 6, p. 457-464, 2014.

ANZANELLO, R.; FIALHO, F. B.; SANTOS, H. P. dos. Chilling requirements and dormancy evolution in grapevine buds. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 42, n. 4, p. 364-371, 2018.

ARPINO, P. LC-MS: principles and instrumentation. *In*: NIESSEN, W (Ed.). **The Encyclopedia of Mass Spectrometry**, Elsevier: Amsterdam, 2006. p. 133-145.

ASSUNÇÃO, M. *et al.* Graft compatibility of *Vitis* spp.: the role of phenolic acids and flavanols. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 207, p. 140-145, 2016.

ASSUNÇÃO, M. P. *et al.* Gallic acid, sinapic acid and catechin as potential chemical markers of *Vitis* graft success. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 246, p. 129-135, 2019.

BARON, D. *et al.* An overview of grafting re-establishment in woody fruit species. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 243, p. 84-91, 2019.

BEAUVIEUX, R.; WENDEN B.; DIRLEWANGER, E. Bud Dormancy in Perennial Fruit Tree Species: A Pivotal Role for Oxidative Cues. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v. 9, p. 657, 2018.

BERLATO, M. A.; CORDEIRO, A. P. A. Sinais de mudanças climáticas globais e regionais, projeções para o século XXI e as tendências observadas no Rio Grande do Sul: uma revisão. **Agrometeoros**, Passo Fundo, v. 25, n. 2, 2017.

BETTONI, J. C. Indução do enraizamento em estacas lenhosas do porta-enxerto de videira VR043-43 submetidas a lesões e aplicação de auxinas. **Evidência**, Joaçaba, v. 14, n. 2, p. 129-138, 2014.

BIASI, L. A.; CARVALHO, R. I. N. de; ZANETTE, F. Dinâmica da dormência de gemas de videira e quiveiro em região de baixa ocorrência de frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1244-1249, 2010.

BOTTON, M. *et al.* **Boas práticas agrícolas na viticultura**: manejo de pragas e doenças. Brasília: SEBRAE, 2011. p. 11-34.

BOTELHO, R. V. *et al.* Propagação da videira 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca*) enxertada sobre o porta-enxerto 'VR-043-43' (*V. vinifera* X *V. rotundifolia*). **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 5, p. 359-364, 2009.

BRASIL. Portaria nº 36, de 5 de abril de 2019. Zoneamento Agrícola de Risco Climático. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 6 de abril de 2019. Disponível em:

<http://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/70889258> Acesso em: 22 set. 2020.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 52, p. 98-111, 2010.

CAMARGO, U. A. Técnicas de produção vitícola com ciclos sucessivos em condições tropicais. *In*: WORKSHOP INTERNACIONAL DE PESQUISA, 2004, Petrolina. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 85-95.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, 2011.

CANAS, S. *et al.* Phenolic compounds involved in grafting incompatibility of *Vitis* spp: Development and validation of an analytical method for their quantification. **Phytochemical Analysis**, Medford, n. 26, p. 1-7, 2015.

CATO, C. *et al.* Sinergism among auxins, gibberellins and cytokinins in tomato cv. Micro-Tom. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 549-553, 2013.

CAVALCANTI, F. R.; BUENO, C. J.; ALMANÇA, M. K. **Declínio e morte de plantas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 40 p.

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

COPES, D. Graft union formation in Douglas-fir. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 56, n. 3, p. 285-289, 1969.

CORSO, M. *et al.* Grapevine rootstocks differentially affect the rate of ripening and modulate auxin-related genes in Cabernet Sauvignon berries. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, n. 7, v. 69, p. 1-14, 2016.

CUI, K. *et al.* Comparison of sample pretreatment methods for the determination of multiple phytohormones in plant samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, Valência, v. 121, p. 25-31, 2015.

DARIKOVA, J. A. *et al.* Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock (a review). **Journal of Siberian Federal University**, Krasnoyarsk Krai, v. 4, n. 1, p. 54-63, 2011.

- DAVIES, P. J. The Plant Hormones: their nature, occurrence, and functions. **Plant Hormones**, Netherlands, p. 1-15, 2010.
- DIAZ, G. A.; ESTERIO, M.; AUGER, J. Effects of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine rootstocks. **Ciência e Investigación Agraria**, Santiago, v. 36, n. 3, p. 381-390, 2009.
- ENDERS, T. A; STRADER, L. C. Auxin activity: past, present, and future. **American Journal Botanic**, Conecticut, v. 102, n. 2, p. 180-196, 2015.
- ERREA, P. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n. 74, p. 195-205, 1998.
- ERREA, P.; GARAY, L.; MARÍN, J. A. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 112, n. 1, p. 135-141, 2001.
- FERNANDEZ-GARCIA, N.; CARVAJAL, M.; OLMOS, E. Graft Union Formation in Tomato Plants: Peroxidase and Catalase involvement. **Annals of Botany**, Leicester, n. 93, p. 53-60, 2004.
- FEUCHT, W.; TREUTIER, D.; KEUKENKAMP, I. Growth enhancement of grapevine callus by catechin on auxin-free media. **Vitis**, Siebeldingen, v. 37, n. 2, p. 67-71, 1998.
- GABRIELSSON, J.; LINDBERG, N-O.; LUNDSTEDT, T. Multivariate methods in pharmaceutical applications. **Journal Chemometrics**, Amsterdam, v. 16, p. 141-160, 2002.
- GAINZA, F.; OPAZO, I.; MUÑOZ, C. Graft incompatibility in plants: Metabolic changes during formation and establishment of the rootstock/scion union with emphasis on *Prunus* species. **Journal of Agricultural Research**, Punjab, v. 75, p. 28-34, 2015.
- GARDIMAN, M. *et al.* Ingrossamento anomalo del punto d'innesto in barbatelle innestate: aspetti varietali e fisiologici. **Italus Hortus**, Firenze, v. 14, p. 35-39, 2007.
- GARIGHAN, J. de A. **Quantificação de hormônios durante a dormência de gemas de macieira**. 2017. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; GOMES, V. N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 322-324, 2004.
- GASPAR, T. H. *et al.* **Peroxidases 1970-1980**: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genève: Université de Genève, Centre de Botanique, 1982. 324p.

GEBHARDT, K. Activation of indole-3 acetic acid oxidase from horseradish and *Prunus* byphenols and H₂O. **Plant Growth Regulation**, Penrith, v. 1, p. 73-84, 1982.

GOULART, P. B; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Efeito dos cofatores hidroquinona, prolina e triptofano no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus Grandis* x *e. urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 1017-1026, 2011.

GOUSSARD, P. G. Effect of hot-water treatments on vine cuttings and one-yearold Graits. **Vitis**, Siebeldingen, n. 16, p. 272-278, 1977.

GIJSEGEM, F. V. Manipulation of ABA content in *Arabidopsis thaliana* modifies sensitivity and oxidative stress response to *dickeya dadantii* and influences peroxidase activity. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v. 8, n. 456, p. 1-13, 2017.

GRANETT, J. *et al.* Biology and management of grape phylloxera. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 46, p. 387-412, 2001.

GRAMAJE, D.; ARMENGOL, J. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 9, p. 1040-1055, 2011.

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

GREGORY, P. J. *et al.* Contributions of roots and rootstocks to sustainable, intensified crop production. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, n. 64, p. 1209-1222, 2013.

GROHS, D. S. *et al.* **Guia visual para avaliação da qualidade em mudas de videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015a. Folder.

GROHS, D. S. *et al.* Levantamento da qualidade fitossanitária e morfológica na produção comercial de mudas de videira. *In*: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 15., 2015, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015b.

GROHS, D. S. *et al.* Advances in propagation of grapevine in the world. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 39, n. 4, p. 130-144, 2017.

HAWERROTH, F. G. H. *et al.* **Dormência em frutíferas de clima temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 56 p. (DOCUMENTOS, 310).

- HAISSIG, B. E. Influences of auxins and auxin synergists on adventitious root primordium initiation and development. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Springfield, v. 4, n. 2, p. 311-23, 1973.
- HE, W. *et al.* Dissection of the Mechanism for Compatible and Incompatible Graft Combinations of *Citrus grandis* (L.) Osbeck ('Hongmian Miyou'). **International Journal Molecular Science**, Basel, v. 19, n. 2, 505, 2018.
- HERRERO, J. Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. **Journal of Horticultural Science**, Asford, v. 26, n. 3, p. 186-287, 1951.
- HUNTER, J. J. *et al.* **Plant material quality: a compilation of research.** Stellenbosh: ARC-Infruited-Nietvoorbij, 2003. 50 p.
- HUNTER, J. J.; VOLSCHEK, C. G.; FOUCHE, G. W. Graft union abnormality: Some impacting factors. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, Dois Portos, p. 938-943, 2013.
- HUNTER, J. J.; RUFFNER, H. P. Assimilate transport in grapevines - effect of phloem disruption. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 7, p. 118-126, 2001.
- ILIEV, A. *et al.* Technological Investigations for Improvement of Grapevine Propagation Material Production in Bulgaria. Part I. Results of affinity study and comparative testing of paraffins in the production of grafted rooted vines Turkish. **Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences**, Amsterdam, v. 1, p. 1274-1279, 2014.
- IQBAL, N. *et al.* Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v. 8, n. 475, p. 1-19, 2017.
- IRISARRI, P. *et al.* Oxidative stress associated with rootstock–scion interactions in pear/quince combinations during early stages of graft development. **Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 176, p. 25-35, 2015.
- JONARD, R. *et al.* Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using in vitro techniques. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 43, p. 117-128, 1990.
- JUNGES, A. H. Caracterização climática da temperatura do ar em Veranópolis, Rio Grande do Sul. **Agrometeoros**, Passo Fundo, v. 26, n. 2, p. 299-306, 2018.
- PIMENTEL JUNIOR, A. *et al.* Development of rootstocks grapevine and cold stratification time. **Australian Journal of Crop Science**, Queensland, v.12, n. 7, p. 1058-1063, 2018.
- KLESSIG, D. F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, Düsseldorf, v. 26, p. 1439-1458, 1994.

KIEBER, J. J.; SCHALLER, G. E. Cytokinins. **The Arabidopsis Book**, Washington, n. 12, e0168, 2014.

KUHN, G. B. **Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado**: preparação da muda. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. (Sistemas de Produção, 4). Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/muda.htm>> Acesso em: 12 jan. 2020.

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

KÖSE, C.; GÜLERYÜZ, M. Effects of auxins and cytokinins on graft union of grapevine (*Vitis vinifera*). **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 34, n. 2, p.145-150, 2016.

KÖSEA, B.; ÇELİKA, H.; KARABULUTB, B. Determination of calosing performance and vine sapling characteristics on different rootstocks of 'Merzifon Karasi' grape variety (*Vitis vinifera*). **Anadolu Journal of Agricultural Sciences**, Anadolu, v. 30, p. 87-94, 2015.

KOUSSA, T.; BROQUEDIS, M.; BOUARD, J. Importance de l'acide abscissique dans le développement des bourgeons latents de vigne (*Vitis vinifera* L. var. Merlot) et plus particulièrement dans la levée de dormance. **Vitis**, Siebeldingen, v. 33, p. 63-67, 1994.

KIM, J. H.; CHUNG, K. M.; WOO, H. R. Three positive regulators of leaf senescence in *Arabidopsis*, ORE1, ORE3 and ORE9, play roles in crosstalk among multiple hormone-mediated senescence pathways. **Genes & Genomics**, Seoul, v. 33, n. 4, p. 373-381, 2011.

LANG, G. A *et al.* Endo-, para-, ecodormancy: Physiological terminology and classification for dormancy research. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 3, p. 371-377, 1987.

LANÇAS, F. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 5, p. 27-46, 2013.

LAVEE, S. Ethephon action in growth and abscission control. *In*: FUCHS Y., CHALUTZ E. (Ed.) **Ethylene**: biochemical, physiological and applied aspects. Dordrecht: Springer, 1984. (Advances in Agricultural Biotechnology) p. 255-266.

LEE, T. T.; STARRATT, A. N.; JEVNIKAR, J. J. Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: structure-activity relationships. **Phytochemistry**, Nantes, v. 21, p. 517-523, 1982.

LERIN, S. *et al.* Levantamento de fungos associados ao declínio e morte de videiras em mudas comerciais. *In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14. ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 10.*, 2016, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa uva e Vinho, 2016. p. 77.

LIU, J. *et al.* The WOX11-LBD16 pathway promotes pluripotency acquisition in callus cells during de novo shoot regeneration in tissue culture. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 59, n. 4, p. 734-743, 2018.

LJUNG, K. *et al.* Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. **The Plant Cell**, Waterbury. v. 17, n. 4, p. 1090-1104, 2005.

MACEDO, F. P. M. de *et al.* Uso de etefon na desfolha de mudas de macieira 'fuji suprema' sob o porta-enxerto G202. *In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 13.*, 2018, São Joaquim. **Resumos...** São Joaquim: SENAFRUT, 2018. p. 216.

MALAMY, J. *et al.* Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science**, Nova York, v. 250, p. 1002-1004, 1990.

MANDELLI, F. *et al.* Fenologia da videira na Serra Gaúcha. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 9, n. 1-2, p. 129-144, 2003.

MAROLI, L. *et al.* Produção de mudas de videira cv. Bordô/Paulsen 1103 pela enxertia de mesa com forçagem. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 673-679, 2014.

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

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.

MAY, P. **Using grapevine rootstocks: the australian perspective**. Cowandilla: Winetitle, 1994. 62 p.

MAYER, J. L. S.; BIASI, L. A.; BONA, C. Capacidade de enraizamento de estacas de quatro cultivares de *Vitis* L. (Vitaceae) relacionada com os aspectos anatômicos. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 563-568, 2006.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids: as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, Basel, v. 19, p. 16240-16265, 2014.

- MELKE, A. The physiology of chilling temperature requirements for dormancy release and bud-break in temperate fruit trees grown at mild winter tropical climate. **Journal of Plant Studies**, Ontario, v. 4, n. 2, p.110-156, 2015.
- MELLO, L. M. R. de; MACHADO, C. A. E. **Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul**: 2013 a 2015. Brasília: Embrapa, 2017. 85 p.
- MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura Brasileira**: panorama 2018. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2019. 12 p. (Comunicado Técnico, 210).
- MONIS, J. The Impact of Fungal Trunk Pathogens in Grapevine Nurseries. **Wine Business Monthly**, Sonoma, p. 44-47, 2012.
- MOSSE, B. **Graft incompatibility in fruit trees**. England: Commerce of Bureau Horticultural Plant Crops, 1962. 36 p. (Technical Communication, 28).
- NANDA, A.; MELNYK, C. W. The role of plant hormones during grafting. **Journal of Plant Research**, Tohoku, v. 131, n.1, p. 49-58, 2018.
- NACHTIGAL, J. C; SCHNEIDER, E. P. **Recomendações para produção de videiras em sistemas de base ecológica**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. 68 p. (Documentos, 65).
- NOGUEIRA, N. M. Méritos comparativos da cromatografia em fase líquida de alta eficiência em escala convencional e minituarizada. **Revista Brasileira de Farmacologia**, Curitiba, v. 92, n. 2, p. 44-50, 2011.
- NORIEGA, X.; PÉREZ, F. J. ABA biosynthesis genes are down-regulated while auxin and cytokinin biosynthesis genes are up-regulated during the release of grapevine buds from endodormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**, Van Godewijckstraat, v. 36, n. 4, p. 814-823, 2017.
- ORRANTIA-ARAUJO, M. A. *et al.* Changes in the endogenous content and gene expression of salicylic acid correlate with grapevine bud dormancy release. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dresden, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10100-9>. Acesso em: 03 set. 2020.
- PÉREZ, F. J.; RUBIO, S. G; NÚÑEZ, J. O. Erratic bud-break in grapevines grown in warm winter areas related to disturbances in mitochondrial respiratory capacity and oxidative metabolism? **Functional Plant Biology**, Clayton South, v. 34, n. 7, p. 624-632, 2007.
- PERNISOVÁ, M.; KUDEROVÁ, A.; HEJÁTKO, J. Cytokinin and auxin interactions in plant development: metabolism, signalling, transport and gene expression. **Current Protein and Peptide Science**, Gainesville, v. 12, n. 137, p. 137-147, 2011.
- PORIKÁ, H. K. *et al.* Graft compatibility-incompatibility in fruit crops: mechanism and determination techniques. **The Asian Journal of Horticulture**, Tajh, v. 11, n. 1, p. 252-256, 2016.

PEREIRA, I. S. *et al.* Incompatibilidade de enxertia em *Prunus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 9, p. 1519-1526, 2014.

PEREIRA, F. M.; FRACARO, A. A. Efeito do etefon na qualidade da uva 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L.), produzida na entressafra, na região de Jales-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 254-257, 2004.

PINA, A.; PILAR, E.; ALEXANDER, S.; MARTENS, H. Cell-to-cell transport through plasmodesmata in tree callus cultures. **Tree Physiology**, Edmonton, v. 29, p. 809-818, 2009.

PINTO, M. *et al.* **Fisiología de la latencia de las yemas de vid**: hipótesis actuales. Santiago: Grupo de Investigación Enológica, 2007. 16 p.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. **Viticultura Brasileira**: Panorama Setorial em 2010. Brasília: SEBRAE, 2011. 110 p.

REGINA, M. A. Produção e certificação de mudas de videira na França 1. Situação atual da produção. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 586-589, 2002a.

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

REGINA, M. A.; SOUZA, C. R.; DIAS, F. A. N. Propagação de *Vitis* spp. pela enxertia de mesa utilizando diferentes porta-enxertos e auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 897-904, 2012.

RODRIGUES, A. C. *et al.* Peroxidases e fenóis totais em tecidos de porta-enxertos de *Prunus* sp. nos períodos de crescimento vegetativo e de dormência. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 559-564, 2002.

ROOY, S. S. B. *et al.* - Cold-induced physiological and biochemical responses of three grapevine cultivars differing in cold tolerance. **Acta Plant Physiology, Poznan**, v.39, n. 264, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2561-z>. Acesso em: 03 set. 2020

SANTAROSA, E. *et al.* Alterações anatômicas do sistema vascular em porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 4, p. 320-329, 2016.

SCHENATO, P. G. *et al.* Influência do etefon na distribuição de nutrientes e carboidratos e sobre o crescimento em videiras jovens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, p. 217-221, 2007.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

STAMP, J. A. The contribution of imperfections in nursery stock to the decline of young vines in California. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 40, n. 3, p. 369-375, 2001.

SUN, X. Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR 057. **Scientific Reports**, London, v. 6, 24066, 2016.

SAWADA, Y.; HIRAI, M. Y. Integrated LC-MS/MS system for plant metabolomics. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Jena, v. 4, n. 5, e201301011, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TODIC, S.; TESIC, D.; BESLIC, Z. The effect of certain exogenous growth regulators on quality of grafted grapevine rootlings. **Plant Growth Regulation**, Penrith, v. 45, n. 2, p. 121-126, 2005.

VAHDATI, K.; HASSANI, D.; REZAEI, R. Walnut grafting success as affected by different grafting methods, cultivars and forcing treatments. **Acta horticultrae**, Leuven, v. 861, p. 345-352, 2010.

VERGARA, R. *et al.* ABA represses the expression of cell cycle genes and may modulate the development of endodormancy in grapevine buds. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v. 8, n. 812, p. 1-10, 2017.

YIN, H. *et al.* Graft-union development: a delicate process that involves cell-cell communication between scion and stock for local auxin accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 63, p. 4219-4232, 2012.

WAITE, H.; WHITELAW-WECKERT, M.; TORLEY, P. Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine planting material. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 43, n. 2, p. 144-161, 2015.

ZANATHY, G. *et al.* Effect of nitrogen on the carbohydrate content of grapevine canes. **Horticulture Science**, Praga, v. 28, n. 1-2, p. 75-78, 1996.

ZHENG, C. *et al.* Distinct gibberellin functions during and after grapevine bud dormancy release. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 69, n. 7, p. 1635-1648, 2018.

ZHENG, C. *et al.* Effects of Brassinosteroid Associated with Auxin and Gibberellin on Apple Tree Growth and Gene Expression Patterns. **Horticultural Plant Journal**. Beijing, v. 5, n. 3, p. 93-108, 2019.

ZHOU, Q. *et al.* Effects of exogenous growth regulators and bud picking on grafting of grapevine hard branches. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 264, 109186, 2020.

3 CAPÍTULO 1

Épocas de coleta de material vegetal e tempos de armazenagem em câmara frigorífica para obtenção de mudas de videira com elevada qualidade fitotécnica

3.1 Introdução

O sistema de enxertia de mesa apresenta uma série de recomendações ao longo das etapas da produção de mudas de videira, cujo protocolo básico está bem definido, inclusive no Brasil (Regina, 2002; Kuhn *et al.*, 2007). Contudo, Gramaje e Dimarco (2015) destacam que há elevada variabilidade entre viveiros quanto aos métodos aplicados neste sistema. No Sul do Brasil, uma das etapas que mais apresenta variabilidade recai sobre a definição de épocas de coleta de sarmentos nas plantas matrizes. Kuhn (2003) indica que viveiristas da região da Serra Gaúcha, tradicionalmente, realizam esta coleta no final do inverno (visando o máximo acúmulo de horas de frio a campo). Porém, conforme Junges (2018), na região da Serra Gaúcha, de maio a setembro é o período que ocorre a maior variabilidade interanual de temperaturas. Neste caso, anos com oscilações térmicas no período hibernal, causam impactos negativos sobre a uniformidade e a capacidade total de brotação de gemas nos genótipos de clima temperado, pois temperaturas elevadas durante os períodos de frio anulam o efeito das HF acumuladas (Anzanello *et al.*, 2014). Diante disso, têm se percebido que esperar apenas pelo acúmulo de frio natural para a coleta, em muitos anos, o viveirista é surpreendido pela grande desuniformidade na capacidade de brotação e na qualidade de enxertia durante a formação da muda.

Portanto, ajustes fitotécnicos que permitam ao viveirista depender menos de condições ótimas de acúmulo de frio a campo para a realização da coleta em plantas matrizes, são vistos como essenciais na sustentabilidade do sistema de

produção de mudas. Um destes ajustes é a armazenagem refrigerada do material propagativo em câmara com temperatura controlada. Este armazenamento interfere nas respostas de calogênese, brotação e enraizamento da videira (Alley e Peterson, 1977). Quando empregado na quantidade certa, a exposição do material ao frio artificial pode ser benéfica. Assim, a sincronia entre a época de coleta e o tempo de armazenagem refrigerada é a base para viabilidade deste ajuste fitotécnico.

Adicionalmente, na busca da sincronia entre épocas de coletas e tempos de armazenamento destaca-se a possibilidade de utilizar a coleta antecipada, nos períodos iniciais da dormência, permitindo ao viveirista uma otimização da sua capacidade operacional. Nas condições do Sul do Brasil, as coletas antecipadas de estacas de 'Bordô' e 'Paulsen1103', ainda em maio (antecedendo o período de endodormência), apresentaram valores satisfatórios de sobrevivência de mudas pós-enxertia (Maroli *et al.*, 2014). Contudo, nestas coletas precoces, frequentemente ocorre a presença de folhas ativas nas plantas matrizes de determinadas cultivares. Neste caso, o manejo com etileno surge como alternativa para desfolha de plantas. Este fitohormônio está intimamente relacionado aos processos de senescência e queda natural das folhas (Iqbal *et al.*, 2017). Atualmente, em videiras, já existe a possibilidade de aumento dos níveis endógenos de etileno a partir da utilização exógena do seu precursor, o etefon (ácido 2-cloroetilfosfônico). Este insumo tem uso notório na viticultura tropical, na indução artificial da desfolha e uma paralisação temporária do crescimento, mimetizando um estado de dormência em plantas que se apresentam com crescimento vegetativo pleno e ininterrupto nas condições tropicais (Camargo, 2004). Como consequência deste efeito, é possível estabelecer os ciclos de produção, favorecendo o manejo de poda e a organização do dossel produtivo. Contudo, sua utilização com a finalidade de viabilizar a coleta precoce de material propagativo em matrizeiros de videiras ainda não foi explorada.

Neste capítulo foram testados ajustes na etapa de pré-enxertia. Para tanto, os estudos iniciaram a partir de épocas de coleta de material propagativo em plantas matrizes, seguidos de tempos de armazenamento em câmara frigorífica para diferentes anos e cultivares. Posteriormente, foi testado o etefon

como forma de antecipar o estado de dormência e a coleta de material propagativo ainda no outono, sem a perda da qualidade fitotécnica das mudas.

3.2 Material e Métodos

O material vegetal propagativo (estacas de sarmentos de ano) das cultivares utilizadas nos ensaios *in vivo* foi coletado em diferentes datas (conforme os tratamentos descritos na sequência) a partir de plantas matrizes, do jardim clonal da Embrapa. São plantas provenientes do programa de limpeza clonal da Embrapa e encontram-se certificadas para os seguintes grupos virais: GVA, GVB, GLFk, GRPaV, GLRaV, conforme caracterizado por Nascimento (2015). As plantas das cultivares de enxerto, apresentavam em média 12 anos, conduzidas no sistema latada em poda mista (em média, com oito varas de seis gemas cada), espaçadas 1,80x2,50m. As plantas das cultivares de porta-enxerto, apresentam em média seis anos, conduzidas no sistema de mesa horizontal em poda de cordão eporonado, espaçadas 2,00x2,50m. As condições de temperatura do ar (máxima, mínima e média) e precipitação pluvial neste jardim clonal foram registradas por uma estação meteorológica automática, instalada a cerca de 500 m.

Quanto às cultivares selecionadas destacam-se: 1) origem genética: ‘Bordô’ (*Vitis labrusca*), ‘Riesling Itálico’ (*Vitis vinifera*) e ‘BRS Violeta’ (híbrido interespecífico oriundo de cruzamento entre variedades *Vitis labrusca* com *Vitis vinifera*) como cultivares-copa e ‘Paulsen 1103’ (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) como porta-enxerto; 2) ciclo das cultivares-copa (do início da brotação ao final da maturação da uva, para a região da Serra Gaúcha): ‘Riesling Itálico’ 153 dias, ‘Bordô’ 142 dias (Mandelli *et al.*, 2003) e BRS Violeta 150 dias (Camargo *et al.*, 2005); sendo todas consideradas precoces (brotação até 10/09) conforme Mandelli *et al.* (2003).

Para o desenvolvimento deste capítulo foram conduzidos quatro experimentos, instalados de modo a aproveitar os mesmos tratamentos em diferentes contrastes, conduzidos na forma de três grupos experimentais detalhados a seguir.

3.2.1 Grupo 1 - caracterização do efeito conjunto dos fatores: ano, combinação enxerto/porta-enxerto, época de coleta e exposição ao frio artificial

Os tratamentos foram organizados em um esquema fatorial completo do tipo 3x3x3, onde os fatores e níveis foram: fator 1 (ano): 2017, 2018 e 2019; fator 2 (combinação genética de enxerto-E x porta-enxerto-PE): 'Bordô'/'Paulsen 1103', 'Riesling Itália'/'Paulsen 1103' e 'BRS Violeta'/'Paulsen 1103'; fator 3 (época de coleta do material vegetal no jardim clonal associado ao tempo de câmara frigorífica): E1: denominado "final de junho" (coletas em: 02/07/2017, 20/06/2018 e 24/06/2019) e enxertia após 60 dias de exposição ao frio artificial; E2: "final de julho" (02/08/2017, 23/07/2018 e 22/07/2018) e enxertia após 30 dias em frio e E3: "final de agosto" (28/08/2017, 23/08/2018 e 27/08/2019) e enxertia imediatamente após à coleta sem exposição ao frio artificial. Cabe destacar que, neste fator época, o objetivo foi concentrar a coleta na última semana de cada mês. Porém, em decorrência de condições meteorológicas adversas no período da coleta, algumas variações tiveram que ocorrer, porém sem comprometimento dos resultados. As combinações dos tratamentos foram dispostas no delineamento completamente casualizado. A unidade experimental foi representada pela combinação E/PE (muda), sendo adotados 60 repetições por tratamento.

O sistema de enxertia utilizado na produção das mudas foi o de mesa, baseado no protocolo definido por Regina (2002), Kuhn *et al.* (2007) e Waite *et al.* (2015), conforme detalhado a seguir. As coletas de sarmentos no jardim clonal foram realizadas no início da manhã, entre 8:00 e 10:00 horas. Imediatamente à coleta, as estacas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% durante 10 min e, após escorrimento, acondicionadas em filme plástico e mantidas armazenadas em feixes (com 1,00 m de comprimento) dispostos horizontalmente em câmara frigorífica (3 ± 1 °C) (Fig.1A) até o momento da enxertia (Fig.1B e 1C). Por ocasião da pré-enxertia, os feixes de sarmentos foram retirados do filme plástico e aclimatados em temperatura ambiente por 24 horas, mantendo a base do feixe em hidratação apenas em água. Posteriormente, estacas foram cortadas (35 cm para o porta-enxerto e 3,0 cm para o enxerto), de modo que, selecionou-se para uso apenas aqueles com diâmetro entre 7 e 8 mm. A enxertia foi realizada com máquina semi-

automatizada do tipo ômega (Omega Star®) (Fig.1D). Após, as mudas foram submetidas ao processo de parafinação, com a utilização da cera comercial ACTYGREEF® (origem Espanha - empresa Quimiwax, contendo 0,01% de oxyquinolinona e 0,00175% de 2,5DBA), previamente dissolvida em banho-maria na temperatura de 65-70°C. Os enxertos foram submergidos na cera durante 1 a 2s e após, resfriados em água à temperatura média de 23°C. As estacas enxertadas foram então acondicionadas em caixas contendo uma camada de vermiculita do tipo média-fina cobrindo cerca de 3 cm a base da estaca do porta-exerto, sendo adicionado água até atingir-se 70% de umidade (Fig.1E), conforme proposto por Waite *et al.* (2015). Posteriormente, as caixas foram fechadas com filme plástico para manutenção da umidade acima de 85% no seu interior. As caixas com as estacas enxertadas foram submetidas à etapa de forçagem em câmara de crescimento (fitotron) com controle de temperatura. Durante os dois primeiros dias a temperatura foi mantida entre 27 e 28°C, sendo elevada para 28-29°C a partir do terceiro dia. Para retirada das mudas da câmara de forçagem foram adotados os seguintes critérios: 1º) quando o percentual de mudas com calogênese ou brotação aparente estivesse superior a 90%; 2º) caso este percentual não tivesse sido atingido até o 35º dia de forçagem o material foi retirado da câmara. Posteriormente, as caixas com mudas foram submetidas à aclimatização durante sete a 10 dias, em estufa agrícola coberta por sombrite 70%, tendo o controle da temperatura entre 27 e 29°C e umidificação do ar (UR) pela aplicação de nebulização intermitente acionada toda vez que UR<70%. Após saída da aclimação, as mudas foram consideradas aptas ao plantio no viveiro (Fig.1F e 1G).

Nas mudas aclimatadas, foram realizadas as avaliações dos indicadores fitotécnicos de qualidade. Neste caso, foram consideradas as seguintes variáveis: (1) frequência de plantas com formação de calo na enxertia, (2) frequência de plantas com presença de brotação e (3) frequência de plantas com crescimento de raízes adventícias; (4) percentual de formação do calo no entorno da região da enxertia (conforme escala proposta por Celik, 2000) que têm como limites: calo completo (75-100%) (Fig.1H1), parcial (25-50%) (Fig.1H2) e incompleto (0-25%) (Fig.1H3); (5) diâmetro frontal do calo em relação ao diâmetro do porta-enxerto; (6) estágio de desenvolvimento dos brotos no enxerto (conforme Eichorn e Lorenz, 1977).

Além das seis variáveis de qualidade foi obtido o indicador 'escore_muda' (adaptado de Lajeunesse, 2011), utilizado para avaliar o desempenho dos tratamentos em formar mudas, conforme a sequência de cálculos: 1º) escore relativo: o valor absoluto de uma variável de qualidade, no mesmo tratamento e combinação genética, foi dividido pelo valor máximo dentre todos os tratamentos. Com esta relativização, minimizou-se o efeito de escala entre as variáveis; 2º) escore médio: foi realizada a média aritmética dos escores relativos das seis variáveis de qualidade. Este indicador expõe o comportamento geral das variáveis da qualidade. Quanto mais acima de zero e próximo ao valor 1, maior a capacidade de certo tratamento em aumentar a qualidade da muda.

Nas análises estatísticas utilizou-se a exploratória na forma de gráficos de diagrama de caixas (*box-plot*) para verificação de tendências na distribuição dos dados entre tratamentos. Também, análise multivariada foi aplicada, a partir do método dos componentes principais (PCA – *Principal Components Analysis*). Para adequação dos valores das variáveis à PCA, estas foram previamente autoescaladas para remoção da influência da ordem de grandeza das unidades de medida e, posteriormente, centradas à média. Cada PCA integrou os 'escores' dos fatores com os 'pesos' (*loadings*) das variáveis da qualidade. Por definição, os 'escores' representam as relações entre as amostras já os 'pesos' as relações entre variáveis. A partir do gráfico bidimensional da PCA contendo 'escores' e 'pesos' é possível, de maneira concomitante, identificar possíveis agrupamentos presentes nos dados a partir da disposição das amostras, bem como, a participação das variáveis naquele padrão observado.

Para o contraste de grupos independentes na espacialização da PCA, foram ajustadas barras de desvio padrão múltiplo ($\pm 2\sigma$). Ao se contrastar os grupos, aqueles que não se sobrepuseram vertical ou horizontalmente, foram considerados distintos. Os testes estatísticos foram realizados a partir do *software R*, pacote *Agricolae* (R Core Team, 2020). Para a análise multivariada foi utilizado o *software ChemoStat* (Helfer *et al.*, 2015).

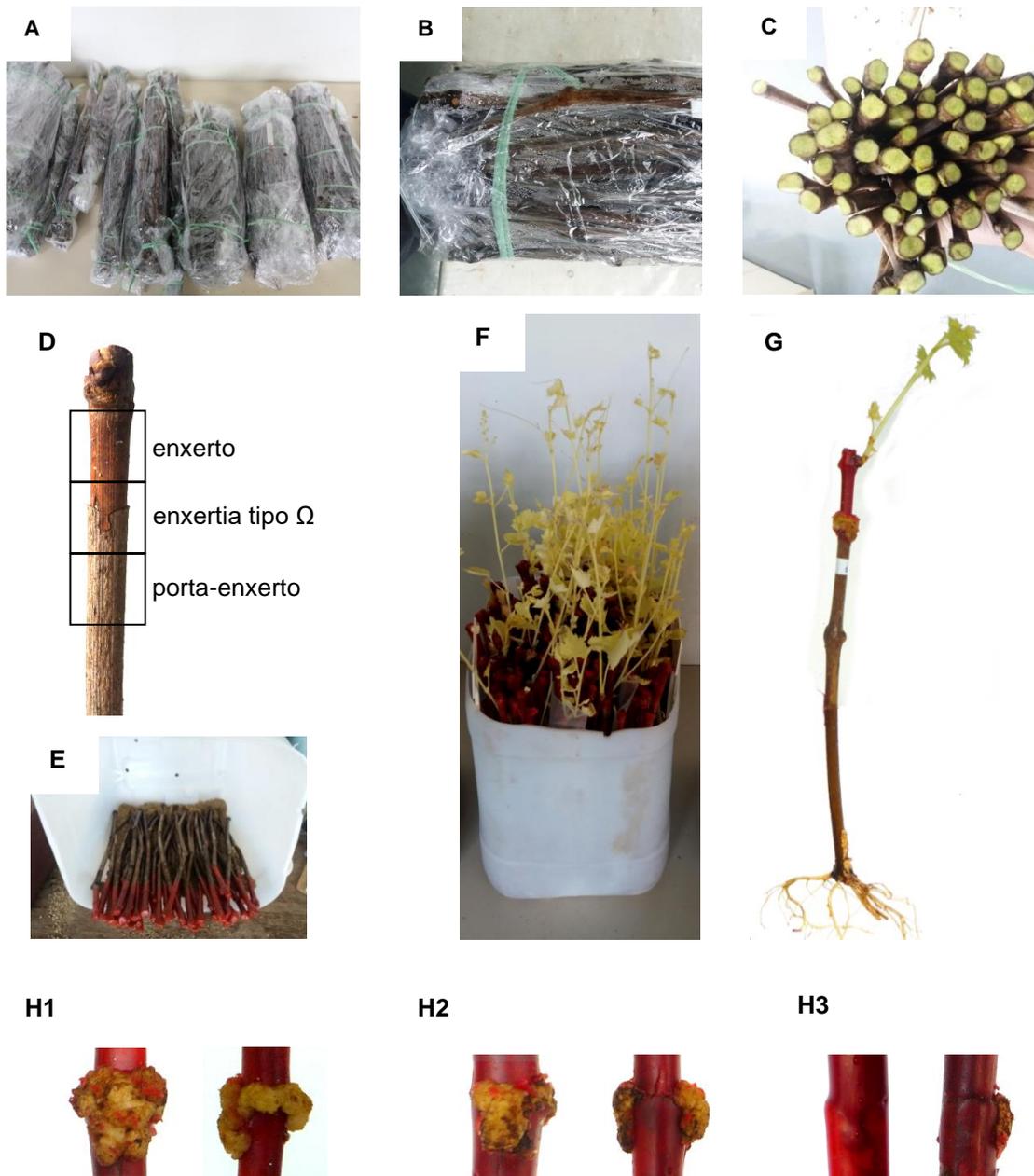


FIGURA 1. Aspectos gerais da metodologia empregada para produção de mudas *in vivo*: feixes de material vegetal na câmara frigorífica (A); detalhe do feixe (B) e aspecto interno dos sarmentos três meses após armazenagem (C); detalhe de enxertia do tipo ômega (D); mudas em pré-forçagem (E); mudas pós-aclimatação (F); detalhes de muda pós-aclimatação (G); exemplos de classes de calogênese de enxertia (H): completa (H1), parcial (H2) e incompleta (H3).

3.2.2 Grupo 2 - caracterização do efeito isolado dos fatores: época de coleta e exposição ao frio artificial

Os tratamentos foram aplicados junto ao grupo 1 em esquema unifatorial, empregando a combinação 'Bordô'/'Paulsen1103', em dois anos (2018 e 2019). Oito tratamentos foram contrastados: 1-coleta em junho (20/06/2018 e 24/06/2019) e enxertia após 60 dias em frio (proveniente do grupo 1); 2-coleta em junho e enxertia sem frio; 3- coleta em julho (23/07/2018 e 22/07/2018) e enxertia após 60 dias em frio; 4-coleta em julho e enxertia após 30 dias em frio; 5-coleta em julho e enxertia sem frio; 6-coleta em agosto (23/08/2018 e 27/08/2019) e enxertia após 60 dias em frio; 7-coleta em agosto e enxertia sem frio (grupo 1); 8- coleta entre abril e maio (20/05/2018 e 16/04/2019) e enxertia após mais de 90 dias em frio (denominada "coleta antecipada").

O delineamento experimental, sistema de produção mudas e avaliações, seguiram o exposto no grupo 1. Nas análises estatísticas, após a verificação da normalidade dos dados a partir de Kolmogorov-smirnov ($p < 0,05$), utilizou-se o teste não-paramétrico do Qui-quadrado ($p < 0,05$), seguido do teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes (para comparação de médias) e Q-Cochran de amostras relacionadas (para comparação de frequências). Os testes estatísticos foram realizados a partir do *software* R, pacote *Agricole* e *Kendall* (R Core Team, 2020).

3.2.3 Grupo 3 - ajustes para maximizar a sincronia da época de coleta com a exposição ao frio artificial

Os tratamentos foram aplicados junto aos grupos 1 e 2, empregando a combinação 'Bordô'/'Paulsen1103'. Este grupo experimental foi constituído por dois experimentos (um referente ao ajuste no tempo de exposição do material vegetal ao frio artificial e outro para o manejo de etefon) detalhados a seguir.

Quanto ao experimento para ajustes no tempo de exposição do material vegetal ao frio artificial, realizado apenas em 2019, quatro tratamentos foram contrastados em esquema unifatorial: 1-coleta em junho (24/06/2019) sem frio (grupo 2); 2-coleta em junho e enxertia após 30 dias em frio (grupo 2); 3-coleta em junho e enxertia após 60 dias em frio (grupo1); 4-coleta em junho e enxertia após 90 dias em frio. O delineamento experimental, sistema de produção mudas e avaliações, seguiram o exposto no grupo 1.

Na análise estatística, foram ajustados modelos de regressão para comparação entre tratamentos nas variáveis de qualidade. Para tanto, após a verificação da normalidade dos dados a partir de Kolmogorov-smirnov ($p < 0,05$), utilizou-se o teste paramétrico do ANOVA ($p < 0,05$), seguido de análise do valor- p dos modelos de regressão, para ajuste das equações lineares ou não-lineares. Os testes estatísticos foram realizados a partir do *software* R, pacote *Agricolae* (R Core Team, 2020).

Quanto ao experimento para manejo do etefon, visando coletas antecipadas, em 2018, os tratamentos foram aplicados em esquema fatorial completo do tipo 2x3, considerando os seguintes fatores e níveis: fator 1 (com e sem etefon); fator 2 (três épocas de coleta, associadas ao tempo de câmara frigorífica): coleta antecipada (20/05/2018) e enxertia após 90 dias em frio; coleta em julho (23/07/2018) e enxertia após 30 dias em frio e coleta em julho e enxertia sem frio. Para os contrastes sem etefon foram utilizados os mesmos tratamentos dos grupos 1 e 2. Neste ano, os seis tratamentos foram aplicados no delineamento completamente casualizado, com 60 mudas como repetição. No segundo ano (2019), foi realizada apenas a validação do tratamento mais responsivo ao etefon em 2018.

O sistema de produção de mudas e avaliações, seguiram o exposto no grupo 1. Adicionalmente, nos tratamentos submetidos ao etefon (ácido 2-cloroetilfosfônico, precursor comercial sintético do etileno), uma das linhas de plantas do jardim clonal foi isolada para esta aplicação. O produto comercial utilizado foi o Ethrel[®], aplicado entre 8h e 9h, com pulverizador atomizador tratorizado, utilizando-se bico tipo esguicho cônico, regulado na vazão de 1.000 L ha⁻¹. Nos dois anos testados, a primeira aplicação foi realizada na primeira semana de abril (06/04/2018 e 02/04/2019), quando as plantas apresentaram início de queda de folhas, tanto em 'Bordô' (Fig.2A1) como 'P1103' (Fig.2A2).

A coleta do material vegetal propagativo destas plantas foi realizada quando as folhas apresentaram queda de mais de 95%. Porém, para se atingir esta proposta, foi necessário modificar a forma de aplicação entre os dois anos. Em 2018, a dose aplicada foi de 2.520 g de i.a ha⁻¹, porém, mesmo aguardando 20 dias após esta aplicação não havia ocorrido o índice esperado, tanto em 'Bordô' (Fig.2B1) como 'P1103' (Fig.2B2). Apesar deste efeito atenuado, já havia uma resposta visível do etefon, em relação ao controle, tanto em 'Bordô' (Fig.2C1) como

'P1103' (Fig.2C2). Além disso, nestes mesmos 20 dias após tratamento, possivelmente em função das condições meteorológicas, a 'Bordô' também apresentou uma ativação do rebrote tanto na parcela controle (Fig.2D1) como na tratada (Fig.2D2) sendo em maior intensidade nesta última. Portanto, aos 20 dias foi optado pela realização de uma segunda aplicação nas duas cultivares, na mesma dose anterior (2.520 g de i.a ha⁻¹). Após essa segunda aplicação, houve a queda dos rebrotes e folhas restantes, tanto em 'Bordô' (Fig.2E1) como em 'P1103' (Fig.2E2), quando a coleta foi realizada (20/05/2018). Para o ciclo 2019, diante deste cenário anterior, foi optado pela aplicação única e com a dose total de 2018 (5.040 g de i.a ha⁻¹). Após, aproximadamente 20 dias, as folhas apresentaram queda de mais de 95% e sem rebrotes tanto em 'Bordô' (Fig.2F1) como em 'P1103' (Fig.2F2), quando a coleta foi realizada (16/04/2019).

Nas análises estatísticas, após a verificação da normalidade dos dados a partir de Kolmogorov-smirnov ($p < 0,05$), utilizou-se o teste não-paramétrico do Qui-quadrado ($p < 0,05$), seguido do teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes (para comparação de médias) e Q-Cochran de amostras relacionadas (para comparação de frequências). Os testes estatísticos foram realizados a partir do *software R*, pacote *Kendall* (R Core Team, 2020).



FIGURA 2. Aspecto geral das plantas na área de manejo do etefon, antes da 1ª aplicação (06/04/2018): 'Bordô' (A1) e 'P1103' (A2). 20 dias após a 1ª aplicação (28/04/2018): ('Bordô' (B1) e 'P1103' (B2)) e o controle ('Bordô' (C1) e 'P1103' (C2)). Detalhe de ramos de 'Bordô' em 2018, após a 1ª aplicação (D2) e o controle (D1). 20 dias após a 2ª aplicação em 2018 (20/05): 'Bordô' (E1) e 'P1103' (E2). 20 dias após a aplicação singular em 2019 (16/04): 'Bordô' (F1) e 'P1103' (F2).

3.3 Resultados

Na sequência, estão detalhados os resultados que foram obtidos em cada grupo experimental, analisados individualmente.

3.3.1 Grupo 1 - caracterização do efeito conjunto dos fatores: ano, combinação enxerto/porta-enxerto, época de coleta e exposição ao frio artificial

Na análise dos fatores, destaca-se inicialmente o efeito ano, o qual envolve todos os cofatores inerentes ao ambiente experimental, que nem sempre são quantificados, e que interferem de modo direto ou indireto em todos demais tratamentos (fatores). Dentre estes cofatores, destacam-se as condições meteorológicas de cada ano de estudo, considerando que este trabalho foi desenvolvido ao longo dos anos de 2017, 2018 e 2019.

Na precipitação pluvial, no período de dezembro a março, a variação do acumulado em relação à normal (561 mm) foi baixa (Fig.3A). De modo geral, 2018 e 2019 apresentaram valores próximos e abaixo da normal (464 e 482 mm, respectivamente). Já 2017, apresentou valor acima da normal (616 mm). Neste caso, foi o mês de março responsável pelo maior acumulado do período, com valor acima da normal (+133 mm). Nos demais meses de 2017, os valores mensais mantiveram-se abaixo das normais. Da mesma forma, em 2018, o mês de março foi o único em que o acumulado mensal manteve-se pouco acima da normal (+8 mm). A exceção neste padrão ocorreu em 2019, quando todos os meses do período apresentaram valores abaixo das normais mensais, especialmente no mês de março (-35 mm). Quanto ao período de abril a agosto, ocorreu maior variação entre anos em relação à normal (734 mm) (Fig.4A). De modo geral, houve redução gradual no volume de precipitação em relação à normal entre 2017 (777 mm), 2018 (728 mm) e 2019 (494 mm). Destaca-se que em 2019 ocorreu a maior diferença abaixo da normal (-240 mm). Quando se analisa a distribuição das chuvas no período, em 2018 ocorreu o maior acumulado nos últimos três meses (jun-ago) (568 mm) em relação a 2017 (307 mm), 2019 (210 mm) e normal do período (481 mm). Em contrapartida, em 2017 e 2019, nos últimos dois meses (jul/ago) houve a menor diferença do acumulado em relação à normal do período (-194 / -204 mm, respectivamente). Apesar desta restrição final, 2017 e 2019 se destacaram com maiores acumulados nos meses iniciais (abr/mai), principalmente em 2017. Neste

ano, o acumulado em abr/mai (470 mm) superou 2018 (159 mm), 2019 (283 mm) e a normal (254 mm). Assim, foi este período que determinou 2017 como o ano com maior acumulado de chuvas dentre os três analisados, superando 2018 (intermediário) e 2019 (maior restrição).

Nas temperaturas do ar, no período de dezembro a março, as mínimas, médias e máximas mensais mantiveram-se próximas às suas normais (Fig.3B). Mesmo assim, foi no ano de 2018 que ocorreram as menores oscilações em relação às normais. Em 2017 e 2019, ocorreram meses com valores acima das normais de forma mais consistente. Em 2017, foi no mês de fevereiro (+1,2°C) e em 2019 foi no mês de janeiro (+0,6°C). Quanto ao período de abril a agosto, ocorreram maiores diferenças em relação às normais entre meses e anos (Fig.4B). Em jul/ago, apenas em 2017 ocorreram médias acima da normal, caracterizando um ano com inverno mais quente. No mês de junho, em 2017 e 2019, ocorreram valores acima da normal. Já nos meses de abr/mai ocorreram valores acima da normal nos três anos. Neste caso, o contraste foi mais expressivo no mês de maio para os três anos, os quais tiveram diferenças de elevação acima da normal, tanto nas temperaturas mínimas (+2,1, +1,2 e +2,7°C, em 2017, 2018 e 2019, respectivamente) quanto nas médias (+1,3, +0,9 e +1,8°C em 2017, 2018 e 2019, respectivamente). Em 2017, dentre os três anos, destaca-se que foram registradas diferenças de temperaturas mínimas e médias acima da normal em agosto (+1,4°C e +1,3°C, respectivamente). Já em 2019, se observou uma similaridade inicial com 2017, com o período de abril a junho mais quente que a normal, destacando-se o mês de junho, mais quente dentre os três anos. Em contrapartida, dentre os três anos, 2018 foi o ano mais regular na condição térmica de outono/inverno, com registros abaixo ou muito similares das temperaturas médias e mínimas normais.

Como consequência dos registros das temperaturas de abr-ago, o acumulado das horas de frio (HF), nos três anos, variou em relação ao valor histórico neste período (360 HF) (Fig.5A). De modo geral, confirmou-se o período outono/inverno mais quente em 2017, com apenas 190HF. Enquanto que 2019 apresentou uma condição intermediária (313 HF), em 2018 as HF ocorreram acima do valor histórico, atingindo 386 HF. Na análise dos anos mais frios, destacaram-se os meses de jul/ago como os mais representativos, sendo que, em 2018, o mês de junho teve maior contribuição, o que aproximou esse ano do valor histórico. Por outro lado, dentre os três anos, o mês de maio não apresentou (em 2017 e 2019)

ou teve pouca contribuição (em 2018) no acúmulo total de HF. Um registro similar também pode ser destacado para o mês de abril, o qual teve contribuição de 11 HF apenas em 2017. Ou seja, destaca-se que, nestes três anos, houve um atraso no acúmulo de HF no período outono/inverno em relação ao valor histórico.

De forma complementar, destaca-se a variação de HF acumulado de abril até as respectivas datas de cada coleta (Fig.5B). A coleta realizada até o final de junho (E1) foi a mais prejudicada no acúmulo de HF, atingindo 88 HF. Quando se considera as coletas no final de julho (E2) e final de agosto (E3), ocorreu o aumento para 187 HF e 288 HF, respectivamente. Cabe salientar ainda, o HF acumulado até E2 apresentou a menor variação (± 32 HF) em relação a média dos três anos. Por outro lado, em E3 apesar do maior valor médio (288 HF) apresentou a maior variação (± 91 HF). Finalmente, confrontando os dados de frio de campo com as épocas de coleta de material propagativo que são utilizadas pelos viveiristas no Sul do Brasil salienta-se o contraste do frio de campo com a capacidade de HF obtido em câmara frigorífica (Fig.5B). Ou seja, enquanto se obteve a campo no máximo 157 HF (2018) em E1 e 225 HF (2018) em E2, se atingiram 1440 e 720 HF em câmara frigorífica, para estas mesmas coletas, respectivamente. Portanto, nos três anos, quanto mais antecipada a época de coleta, maior o prejuízo no acúmulo de frio a campo, porém maior a vantagem para o frio de câmara.

A partir da caracterização das condições meteorológicas, conduziu-se análise exploratória da interação dos fatores: ano, combinação E/PE e associação entre época de coleta e exposição ao frio artificial. A partir da análise por componentes principais do conjunto de dados se obteve o efeito principal determinante desta interação sobre os índices fitotécnicos de qualidade das mudas (estádio do broto, diâmetro do calo, taxa de formação do calo e percentual de plantas com: raízes, brotação e calos). No gráfico de escores gerado, 65,84% da variância total dos dados foi explicada pelas componentes PC1 e PC2 (Fig.6A). A PC1 foi a principal responsável pela separação entre anos, descrevendo 37,80% da variância. No detalhamento desta discriminação, 73% das amostras de 2017 e de 2018 se distribuíram homoganeamente no lado negativo da PC1, enquanto 88% das amostras de 2019 se apresentaram no lado positivo. Já a PC2 separou os anos, porém com menor efeito, descrevendo 28,04% da variância. Finalmente, as barras de desvio padrão múltiplo (vertical e horizontal) do conjunto amostral de 2019 não apresentaram sobreposição aos desvios de 2017 e 2018, que se mantiveram

sobrepostas entre si. Com isso, evidencia-se o efeito principal do ano sobre a interação e qualificam-se as mudas de 2017 e 2018 com características fitotécnicas similares, mas distintas das obtidas em 2019.

A maior qualidade das mudas produzidas em 2019 foi confirmada pelo gráfico de pesos (Fig.6B), onde as seis variáveis fitotécnicas se encontraram positivamente associadas às amostras de 2019 (à direita da PC1). Neste ano, todos os valores dos indicadores de qualidade foram superiores aos de 2017 e 2018. Dentre estes indicadores, o percentual de plantas com brotação, o estágio do broto e a taxa de formação do calo se destacaram como indicadores de maior impacto na qualidade das mudas em 2019. Ao analisar o indicador 'escore_muda' em 2019 (Fig. 6C), 95% das amostras apresentaram valores entre 0,66 e 0,76, seguido por 2017 (0,56 e 0,74) e 2018 (0,54 e 0,68). Adicionalmente, em 2019, além da menor variação deste indicador, os valores extremos, foram superiores aos observados em 2017 e 2018.

A partir da evidência que o ano foi o fator principal de variação do conjunto de dados, determinou-se o desdobramento da interação dos fatores restantes (combinação E/PE e associação entre época de coleta e exposição ao frio artificial) dentro de cada ano de estudo. Assim, na análise seguinte por componentes principais confirmou-se que o segundo fator de maior efeito foi a combinação E/PE (Fig.7). Este fator descreveu 90,23%; 67,75% e 82,53% da variação dos dados, respectivamente, em: 2017 (Fig.7A1), 2018 (Fig.7B1) e 2019 (Fig.7C1). De modo geral, 'Violeta' e 'Bordô' apresentaram os comportamentos mais antagônicos nos três anos, constituindo-se em grupos independentes. Nos anos de 2017 (Fig.7A1) e 2018 (Fig.7B1) este contraste foi mais evidente, de modo que, cada combinação se manteve em quadrantes opostos. Em 2019 (Fig.7C1), apesar da sobreposição parcial das barras de desvios, ainda foi possível identificar a separação destes genótipos. Quanto a 'Riesling', não se definiu um grupo espacialmente isolado, com tendência de manter-se ao centro da PCA e agrupar-se nos mesmos quadrantes de 'Bordô' (Fig.7A1, B1 e C1). Isto demonstra que esta cultivar apresentou maior estabilidade da qualidade entre anos.

De forma complementar, buscou-se caracterizar o comportamento genético de cada combinação em expressar sua tendência de qualidade entre anos (Fig.8A). 'Violeta' apresentou tendência de expor o menor valor médio do 'escore_muda' dentre as três cultivares (0,60), além de maior variação do intervalo interquartil

(0,49 e 0,72) na média dos anos. Já 'Bordô', também na média dos anos, apresentou escore de 0,67 com intervalo interquartilico variando entre 0,59 e 0,75. Quanto a 'Riesling', a tendência de variação do escore foi equiparar-se a 'Bordô', com valor médio de 0,68 e intervalo interquartilico variando de 0,55 a 0,80.

Na continuidade da análise exploratória das interações, os dois fatores restantes (associação entre época de coleta e exposição ao frio artificial) foram responsáveis pelo terceiro efeito de variação (Fig.7). A análise por componentes principais descreveu 52,18%; 43,51% e 24,78% da variação dos dados em: 2017 (Fig.7A2), 2018 (Fig.7B2) e 2019 (Fig.7C2), respectivamente. De modo geral, a coleta de final de agosto sem exposição ao frio artificial (E3) expressou a tendência de constituir um grupo isolado, especialmente quando comparado com a coleta em final de junho (E1) com 60 dias de frio artificial. Já a coleta em final de julho (E2) com 30 dias de frio artificial, não definiu um grupo espacialmente isolado na PCA, mas com tendência de se agrupar na mesma posição da E1 (Fig.7A2, B2 e C2).

De forma complementar, buscou-se caracterizar a capacidade de cada época em afetar a qualidade das mudas entre anos (Fig.8B). Na média dos anos, dentre as três épocas, E3 apresentou menor 'escore_muda' (0,61) com menor valor mínimo extremo (0,21) e menor intervalo interquartilico (0,50 e 0,74). Quanto a E1, na média dos anos e dentre as três épocas, ocorreu o maior 'escore_muda' (0,67) com maior valor máximo extremo (0,85) e um intervalo interquartilico superior à E3 (0,57 e 0,78). Portanto, de modo geral, houve tendência de maior qualidade de mudas nas duas épocas em que o material propagativo coletado foi submetido à exposição do frio artificial em câmara frigorífica.

O desdobramento dos fatores, expondo a resposta de cada genótipo entre as épocas, em cada ano, foi utilizado para se identificar um possível padrão de resposta do 'escore_muda' em cada combinação E/PE. O padrão foi determinado a partir da reanálise daqueles 'escores_muda' que se mantiveram separados em diferentes componentes na Fig.7A1, B1 e C1. Ou seja, para cada cultivar, dentro de cada ano, épocas pertencentes ao mesmo quadrante da PC1 ou PC2 foram considerados com escores similares. Estes, por sua vez, foram ajustados entre si, estabelecendo o padrão de resposta de cada cultivar/ano (Fig.8C). Quanto a 'Violeta', em dois anos (2018 e 2019) o padrão foi o mesmo, com os maiores 'escores_muda' em E1 e E2 e os menores em E3. Em 2017 o menor 'escore_muda' obtido em E2 alterou este padrão. Para 'Riesling', em dois anos (2017 e 2019) o

padrão foi o mesmo, com os maiores 'escores_muda' em E1 e E2 e o menor em E3. Em 2018 o menor escore em E1 alterou este padrão. Quanto a 'Bordô', nos três anos, o padrão foi diferenciado. Em 2017 e 2018 seu padrão seguiu o observado a 'Violeta'. Porém, em 2019, o alto 'escore_muda' em E3 determinou um padrão diferenciado não observado em outro ano ou cultivar. Finalmente, como tendência geral para as três cultivares, na média dos três anos, o destaque recaiu sobre a queda da variabilidade do 'escore_muda' ao longo dos tratamentos. Enquanto que, na coleta de junho com 60 dias de exposição ao frio, os valores de 'escore_muda' variaram em 23%, na coleta em final de agosto sem exposição ao frio, esta variação foi de 45%.

3.3.2 Grupo 2 - caracterização do efeito isolado dos fatores: época de coleta e exposição ao frio artificial

Os resultados obtidos após as análises realizadas no grupo 1 indicaram efeito positivo da utilização do frio artificial na qualidade das mudas. Porém, houve a necessidade de isolar os efeitos da época de coleta (fator ambiente) do tempo de exposição ao frio artificial. Desta forma, tratamentos específicos na cultivar Bordô foram aplicados ao longo de 2018 e 2019 e contrastados entre si conforme resultados apresentados a seguir (Fig.9).

Quando se fixou a época de coleta em final de julho, variando-se apenas a época de enxertia, foi possível isolar o efeito do frio artificial (Fig.9A). Na condição em que o material vegetal não passou pelo frio artificial (coleta e enxertia em julho) houve diferenças do 'escore_muda' entre anos, atingindo maiores valores em 2019 (0,87) do que em 2018 (0,37) (Fig.9A1). Por outro lado, quando houve a exposição ao frio artificial nos períodos de 30 e 60 dias, as amostras de 2018 recuperaram a qualidade de modo positivo e linear até se tornarem idênticas as amostras de 2019. Ou seja, em 2018, o 'escore_muda' foi 0,63 e 0,72 com exposição aos 30 e 60 dias de frio artificial, respectivamente. Já em 2019 houve insensibilidade ao frio artificial e o 'escore_muda' se manteve na média de 0,78 com ou sem exposição.

Para se isolar o efeito da época, de modo independente do frio artificial, foi fixado o tempo de 60 dias em câmara frigorífica, variando-se apenas as coletas em final de junho, julho e agosto (Fig.9A2). Com essa estratégia, não ocorreram diferenças significativas entre os escores de qualidade nos dois anos e em nenhuma das épocas, de modo que, os valores médios foram 0,64 e 0,76 em 2018

e 2019, respectivamente. Portanto, 60 dias de exposição ao frio artificial foi suficiente para minimizar ou eliminar eventuais diferenças impostas pelos fatores épocas e anos.

Outra forma testada para isolar o efeito da época foi realizando a enxertia imediatamente após a coleta, sem exposição ao frio artificial (Fig.9B). Neste caso, se observa que o 'escore_muda' variou entre anos, principalmente nas coletas de julho e agosto. Em 2018, as diferenças entre coletas foram significativas e atingiram os escores de 0,37 e 0,50 em julho e agosto, respectivamente (Fig.9B1). Contudo, em 2019, os valores mantiveram-se constantes em 0,84 nestes mesmos meses (Fig.9B2). Neste último ano, foi realizada uma coleta adicional em junho, seguida de enxertia sem exposição ao frio artificial. Neste caso, ocorreram diferenças significativas entre coletas, de modo que, em junho o 'escore_muda' foi de 0,37, enquanto que em julho e agosto o 'escore_muda' foi de 0,84. Ou seja, existiu incremento linear positivo do escore ao atraso da época de coleta em ambos os anos. Porém, em 2019 este efeito ocorreu em menor intensidade, pois foi percebido apenas na coleta mais precoce de junho. Essa importância do frio artificial nas coletas mais precoces fica ainda mais evidente quando se compara com os dados das coletas tardias. Em agosto (quando a planta ficou exposta aos efeitos do ano até a iminência de sua brotação) não houve vantagem na utilização de frio artificial nos dois anos (Fig.9B1 e 9B2). Contudo, em julho de 2018, o frio artificial incrementou o 'escore_muda' para 0,72 em relação ao tratamento sem exposição (0,37) (Fig.9B1). Esse mesmo efeito positivo do frio artificial também ocorreu em jun 2019, incrementando o escore de 0,52 (sem frio) para 0,69 (Fig.9B2).

Considerando-se que a exposição do material vegetal a 60 dias de frio artificial não acarretou em diferenças nos 'escore_muda' entre épocas e anos (Fig.9A2), fixou-se apenas a época de enxertia. Com isso, foi possível verificar qual associação entre época de coleta e exposição ao frio artificial resultaria nos maiores escores (Fig. 9C). Neste contraste também foi incluído um tratamento com etefon para coleta antecipada no período de maio (2018), elevando-se a exposição ao frio artificial para 90 dias até a data de enxertia em final de agosto. Em 2018, houve queda do escore com o avanço da época de coleta e a diminuição do tempo de exposição ao frio artificial. Neste caso, a coleta antecipada resultou no maior 'escore_muda' (0,76), o qual diminuiu gradativamente ao longo das épocas, atingido seu menor valor em agosto (0,51). Entretanto, cabe ressaltar que com a

exposição ao frio, independente da quantidade (90, 60 ou 30 dias) a diferença entre anos foi insignificante (Fig. 9C). Já em 2019, replicou-se o tratamento na época antecipada (final de abril). Mesmo assim, nesta época, obteve-se alto 'escore_muda' também neste ano (Fig. 9C). Ou seja, a combinação da coleta antecipada com o maior tempo de frio artificial (90 dias), permitiu obter os máximos escores de qualidade, independente das condições meteorológicas de cada ano.

3.3.3 Grupo 3 - ajustes para maximizar a sincronia da época de coleta com a exposição ao frio artificial

A utilização do frio artificial permitiu a manutenção de elevado 'escore_muda', nos experimentos de 2018 e 2019, independentemente da época de coleta (Fig. 9A2). Contudo, o tempo de exposição ao frio sempre se apresentou em associação à época de coleta, gerando confundimento intrínseco na análise. Para contornar isso, em 2019, a partir de uma única coleta no mês de junho foram realizados diferentes contrastes de tempos de câmara, gerando uma resposta exponencial do 'escore_muda' em função do aumento do tempo de exposição ao frio (Fig.10A). Percebe-se que com apenas 30 dias já foi possível obter um 'escore_muda' ótimo (0,84) em relação à condição sem exposição ao frio (0,64). Os demais tempos de exposição ao frio (60 e 90 dias) não proporcionaram incrementos significativos deste indicador. Contudo, quando se discriminou o efeito de exposição ao frio sobre cada variável fitotécnica que constitui o 'escore_muda', observaram-se diferentes padrões de respostas. As variáveis que não sofreram nenhuma influência do tempo foram o estágio de desenvolvimento dos brotos (Fig. 10C), o percentual de mudas com calos (Fig.10D) e raízes (Fig.10G). Em contrapartida, quanto maior o tempo de frio, maior foi o percentual de brotação, seguindo uma resposta linear positiva de 37% (zero dias) para 97% (90 dias) (Fig.10B). O incremento de resposta com o frio também foi registrado na taxa de formação do calo (Fig.10E) e na diferença de diâmetro do calo em relação ao porta-enxerto (Fig.10F), as quais seguiram os padrões quadrático e exponencial, respectivamente. Portanto, apesar dos 30 dias de exposição ao frio artificial favorecer a qualidade geral de mudas, os períodos de 60 a 90 dias permitiram a maximização desta qualidade, especialmente nos níveis de brotação e de calogênese.

Outro fator importante na maximização da qualidade das mudas foi a antecipação da época de coleta. Evidenciou-se que coletas realizadas entre abril e maio favoreceram o máximo 'escore_muda', independentemente do ano testado (Fig.9C). Contudo, a operacionalização desta coleta só foi possível através da utilização do etefon para a desfolha das plantas, pois muitas plantas ainda apresentavam folhas nesta época. Deste modo, tornou-se necessário detalhar quais os impactos deste insumo em outras épocas de coleta e tempos de exposição ao frio artificial. Assim, em 2018, apesar da aplicação do etefon ter sido realizada no início de abril, as coletas nas plantas tratadas e não tratadas (testemunha) foram executadas em diferentes épocas (mai e jul), proporcionando também contrastes de exposição ao frio (90, 30 e zero dias).

De modo geral, houve um efeito positivo do armazenamento prolongado (>90 dias) sobre o 'escore_muda', tanto na condição tratada com etefon quanto na testemunha, ocorrendo valor médio de 0,85 (Fig.11A). Entretanto, com a coleta no final de julho e 30 dias de câmara frigorífica, ocorreu um efeito negativo do etefon (0,42) em relação a testemunha (0,76) (Fig.11A). Esse resultado em julho foi similar ao que ocorreu no final de agosto (com enxertia imediata e sem frio de câmara), onde o 'escore_muda' foi baixo (0,39) e sem diferenças com a testemunha (Fig.11A). Destaca-se, portanto, que o efeito do atraso da época de coleta apresentou a mesma variação negativa sobre a qualidade da muda tanto com etefon como sem.

Para detalhar o efeito do etefon sobre a qualidade da muda, foram consideradas isoladamente as seis variáveis fitotécnicas constituintes do 'escore_muda'. Neste caso, o resultado foi similar ao percentual de brotação (Fig.11B), de mudas com calos (Fig.11D) e taxa de formação de calos (Fig.11E). De maneira geral, as diferenças entre plantas tratadas com etefon e testemunha seguiram o padrão verificado no 'escore_muda' com exceção da formação de raízes (Fig.11G). Neste caso, na coleta antecipada, ocorreu vantagem com a utilização do etefon, apresentado 51% a mais de enraizamento em relação à testemunha. Na taxa de formação do calo, além de seguir a mesma tendência de redução de maio para julho, o efeito do etefon foi mais expressivo e significativo em relação à testemunha (Fig.11E). Quanto às variáveis do estágio de desenvolvimento dos brotos (Fig.11C) e diâmetro do calo em relação ao porta-enxerto (Fig.11F), a variabilidade entre tratamentos não definiu respostas

significativas entre tratado e testemunha. Da mesma forma, o efeito do atraso da época de coleta também não foi percebido nestas variáveis.

A partir destes resultados obtidos em 2018, destaca-se que a coleta antecipada com tratamento prévio de etefon, favoreceu a qualidade geral das mudas, com vantagem expressiva no percentual de plantas enraizadas. Portanto, visando uma validação deste efeito, este tratamento foi repetido em 2019. Neste caso, tanto para o 'escore_muda' (Fig.11A) quanto para as seis variáveis fitotécnicas que o constituem (Fig.11B,C,D,E,F,G), não ocorreram diferenças em relação aos resultados de 2018, mantendo-se valores elevados em todas as comparações (Fig.11).

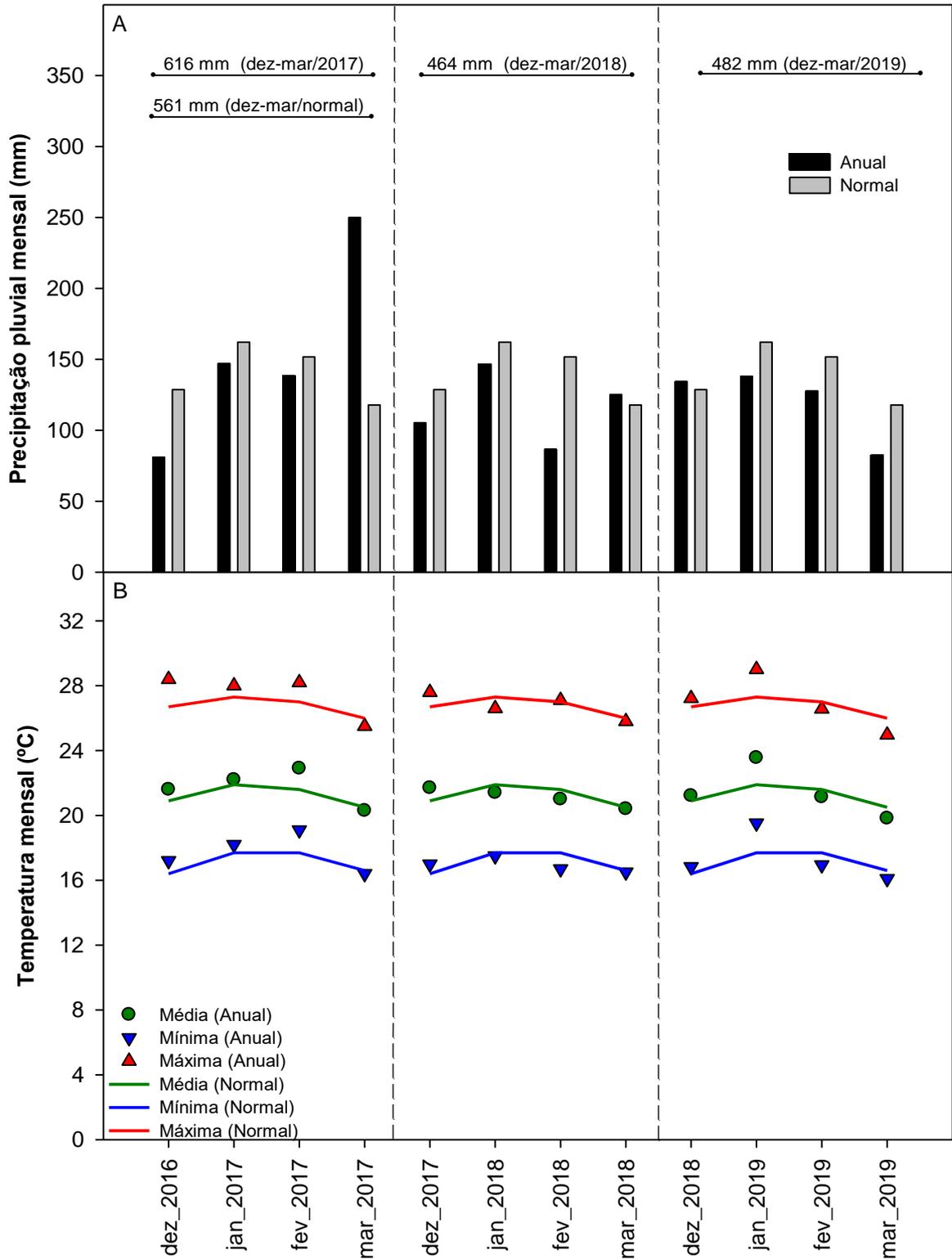


FIGURA 3. Precipitação pluviométrica (A) e temperaturas do ar máximas, médias e mínimas (B) no período de dezembro a março de 2017, 2018 e 2019 e na normal climatológica padrão 1981-2010 de Bento Gonçalves, RS. Estação meteorológica Embrapa Uva e Vinho.

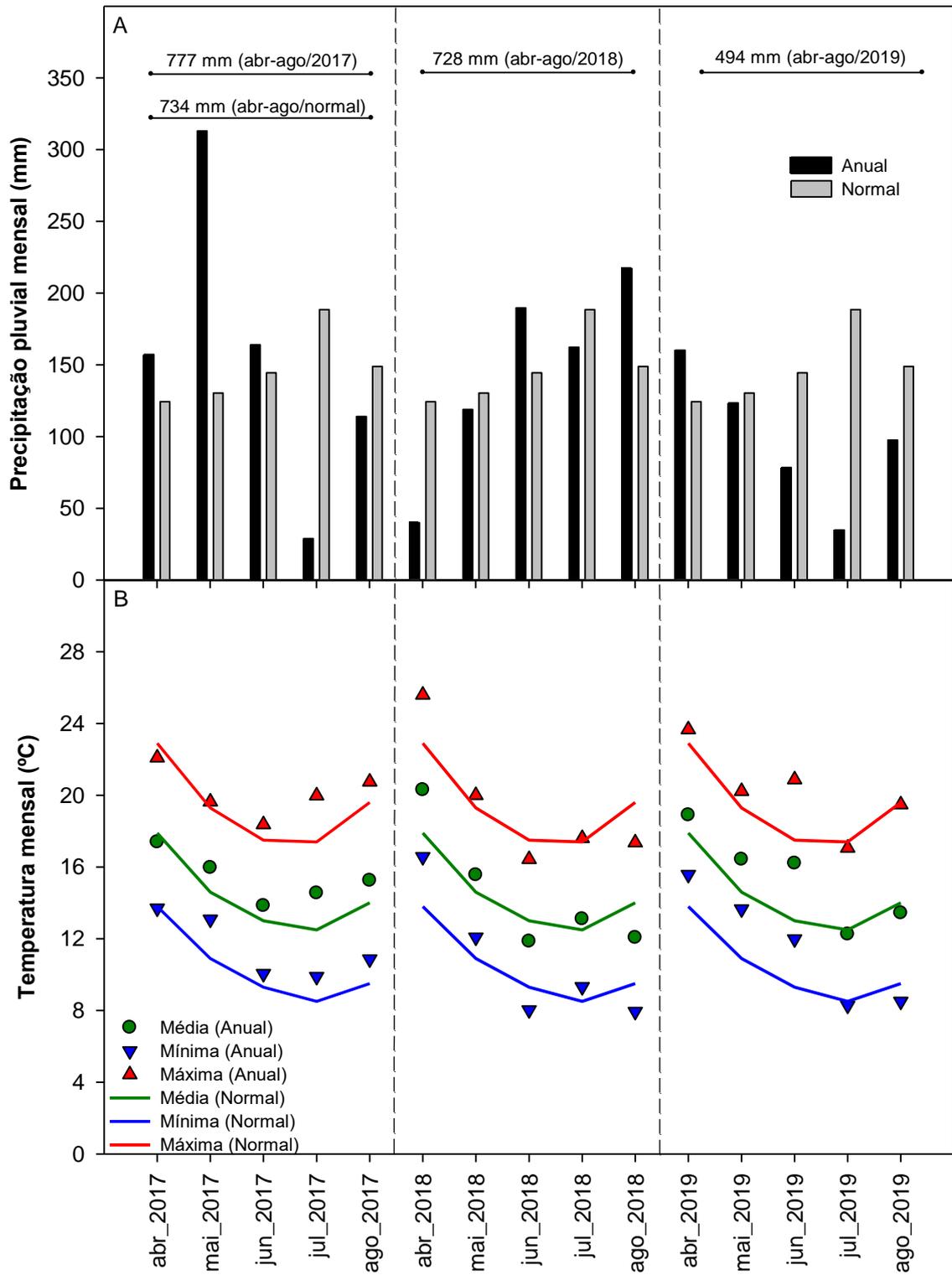


FIGURA 4. Precipitação pluviométrica (A) e temperaturas do ar máximas, médias e mínimas (B) no período de abril a agosto de 2017, 2018 e 2019 e na normal climatológica padrão 1981-2010 de Bento Gonçalves, RS. Estação meteorológica Embrapa Uva e Vinho.

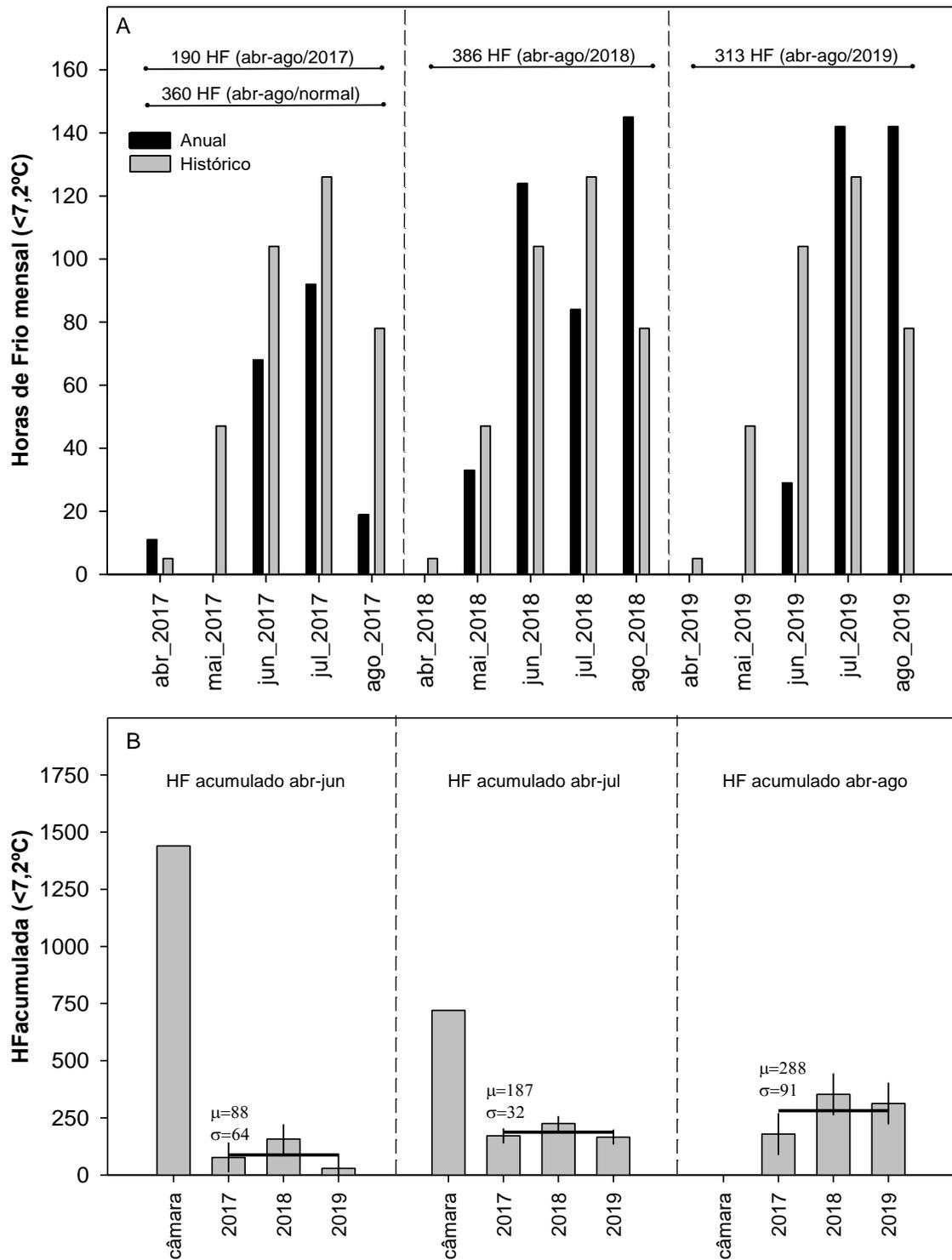


FIGURA 5. Acúmulo de horas de frio (abaixo de 7,2°C) mensal e total, no período de abril a agosto de 2017, 2018 e 2019 (A) Acúmulo de horas de frio de abril até a data de cada de coleta (B). *Câmara: são as HF acumuladas da coleta até a enxertia em final de agosto: JUN (30d), JUL (60d) e AGO (0).

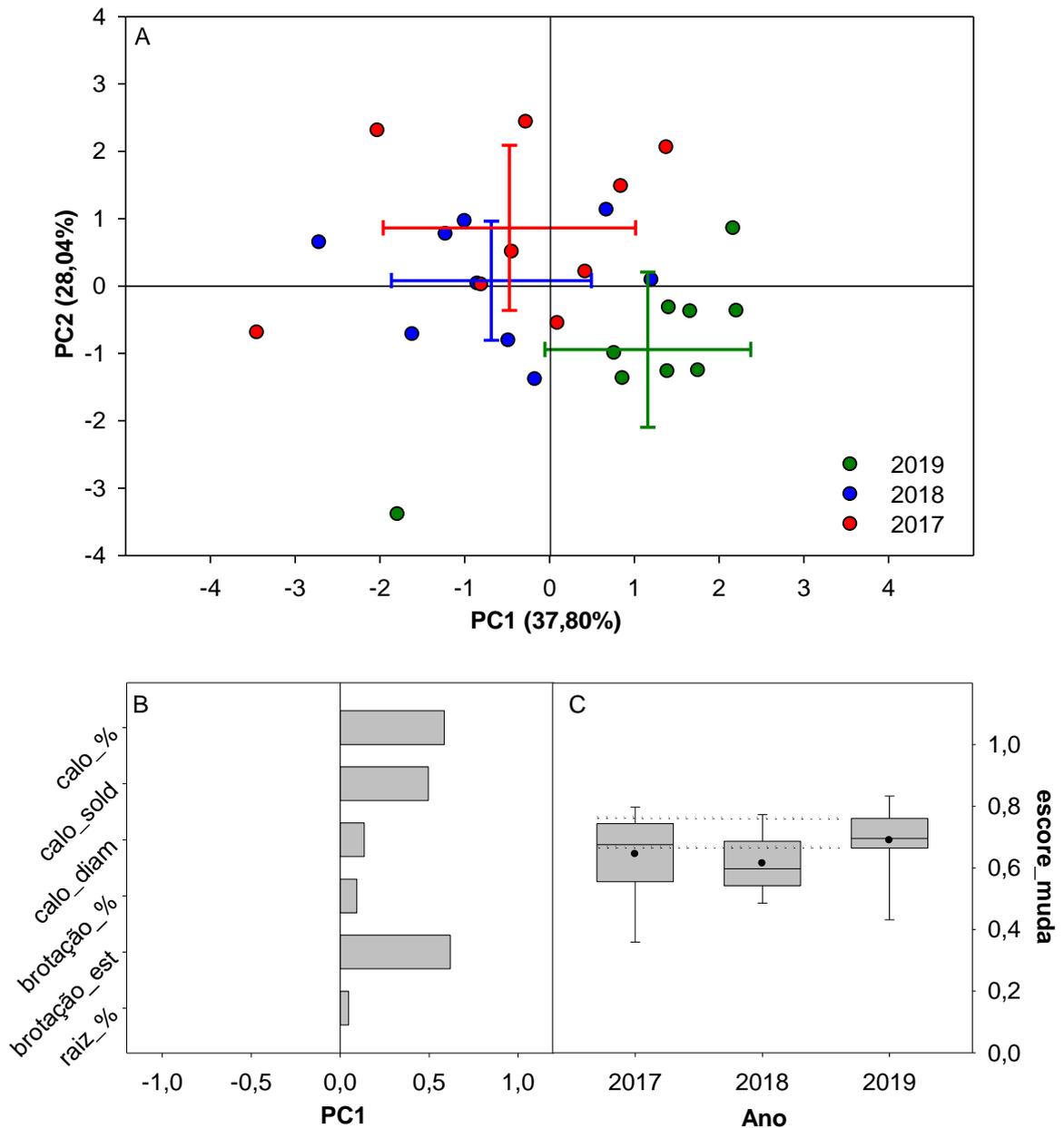


FIGURA 6. Gráfico de escore resultante da PCA formada pelos fatores: anos (2017-17; 2018-18; 2019-19); cultivares (Bordô-B, Riesling Itálico-R, BRS Violeta-V) e épocas de coleta (final de jun-E1, final de jul-E2, final de ago-E3) (A). Gráfico de pesos obtido na PC1 da PCA gerada na Fig.A a partir das variáveis: estágio do broto (brotação_est), diâmetro do calo (calo_diam), taxa de formação do calo (calo_sold) e percentual de plantas com: raízes (raiz_%), brotação (brotação_%) e calos (calo_%) (B). Gráfico de caixas formado pelas observações nos anos de 2017, 2018 e 2019 (C). Na Fig.A, barras múltiplas de desvio padrão não sobrepostas indicam a discriminação amostral entre anos.

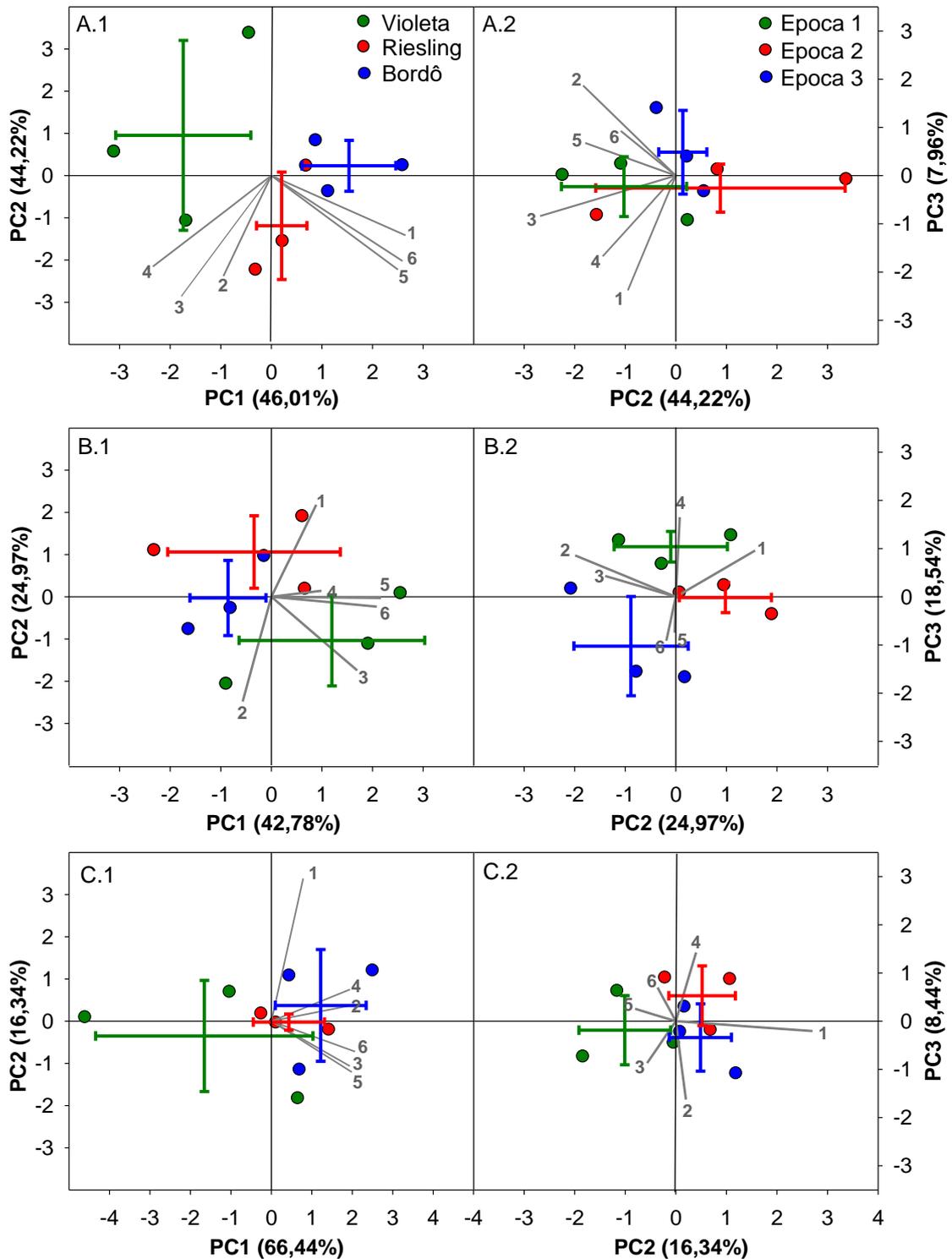


FIGURA 7. Gráficos de escores resultante da PCA formada pelos fatores cultivares (Bordô-B, Riesling-R, BRS Violeta-V) e épocas de coleta (final de jun-Epoca 1, final de jul-Epoca 2, final de ago-Epoca 3) nos anos: 2017 (A1 e A2), 2018 (B1 e B2) e 2019 (C1 e C2). Gráficos de pesos obtidos a partir das variáveis: estágio do broto (1), diâmetro do calo (2), taxa de formação do calo (3) e percentual de plantas com brotação (4) e calos (5) e raízes (6). Barras múltiplas de desvio padrão não sobrepostas indicam discriminação amostral entre cultivares (A1,B1,C1) e épocas (A2,B2,C2).

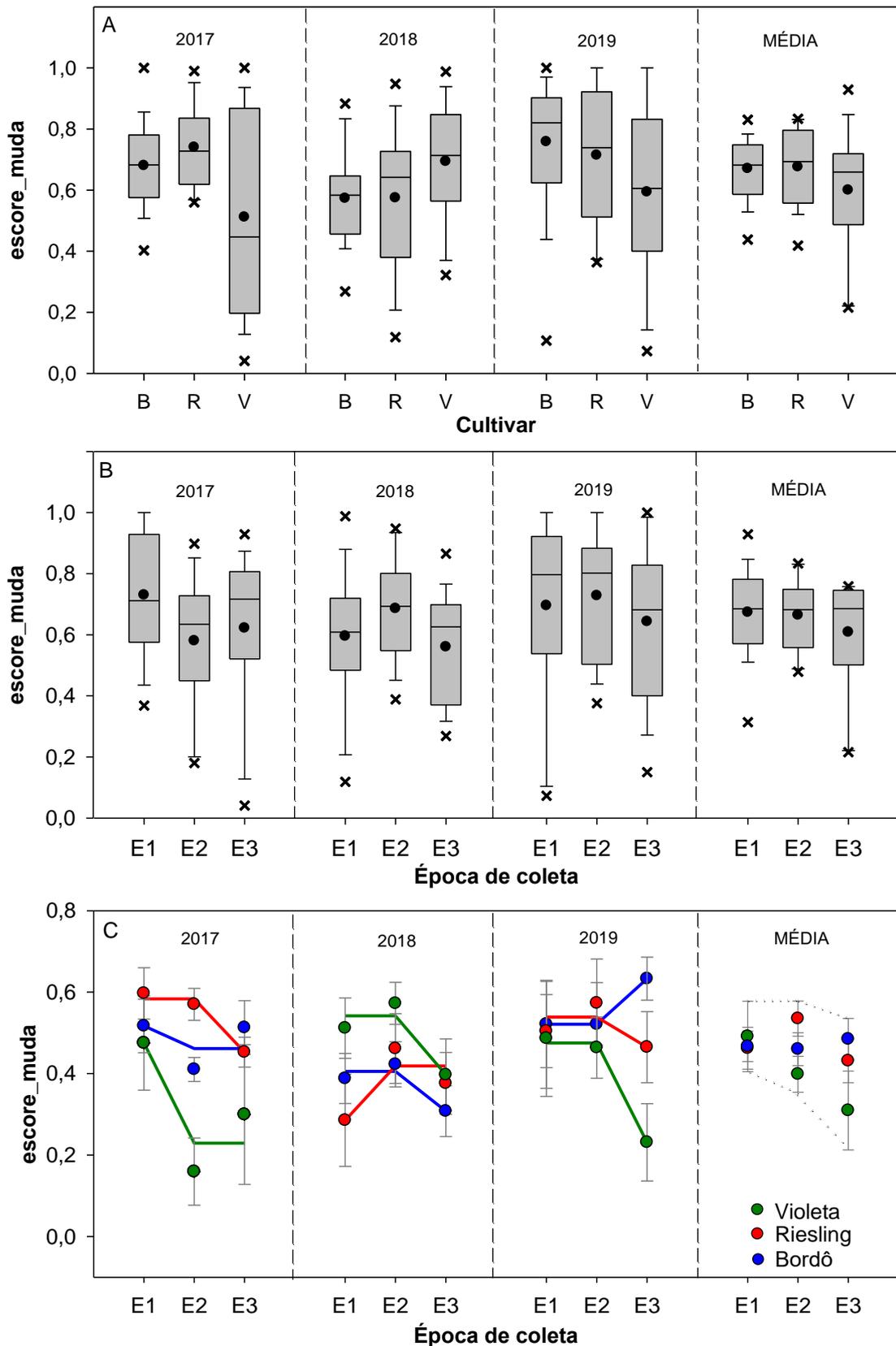


FIGURA 8. Gráficos de caixas formados pelas observações obtidas nas cultivares Bordô (B), Riesling (R) e Violeta (V) (A) e nas épocas de final de jun (E1), final de jul (E2) e final de ago (E3) (B) em três anos. Gráfico de barras de desvio padrão com ajuste das linhas de interação do escore entre épocas para três cultivares (C).

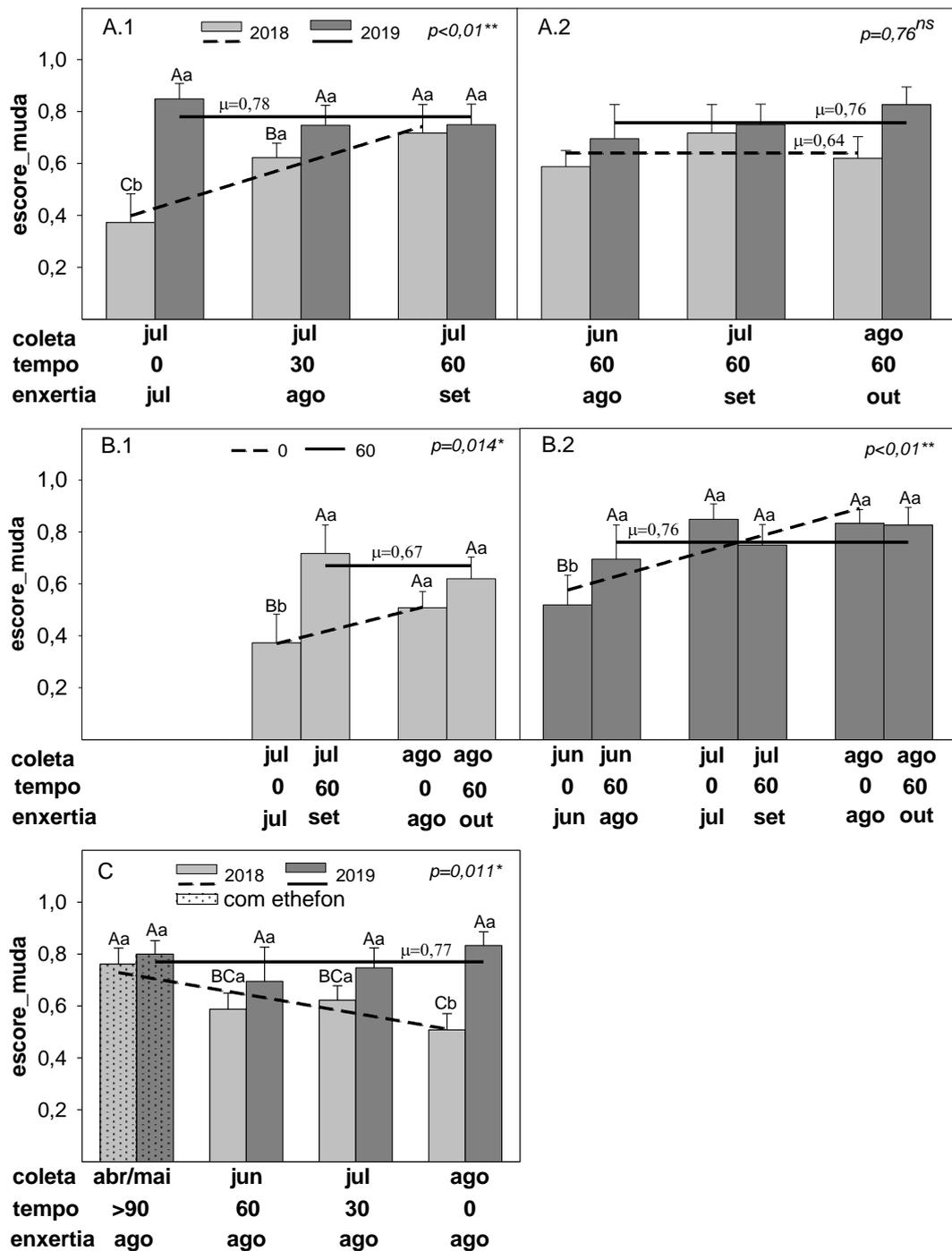


FIGURA 9. Gráfico de barras formado pelos tratamentos aplicados na combinação 'Bordô'/'P1103', nos anos 2018 e 2019: épocas de coleta fixas e tempos de armazenagem variáveis (A1); épocas de coleta variáveis e de enxertia fixas (A2); épocas de coleta e de enxertia variáveis e tempos de armazenagem fixos, em 2018 (B1) e 2019 (B2); épocas de coleta e tempos de armazenagem variáveis e épocas de enxertia fixas (C). *,** e *ns*: significativo a 5%, 1% e não-significativo, respectivamente. ¹Mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas entre colunas não se diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis. ²Erro padrão da média.

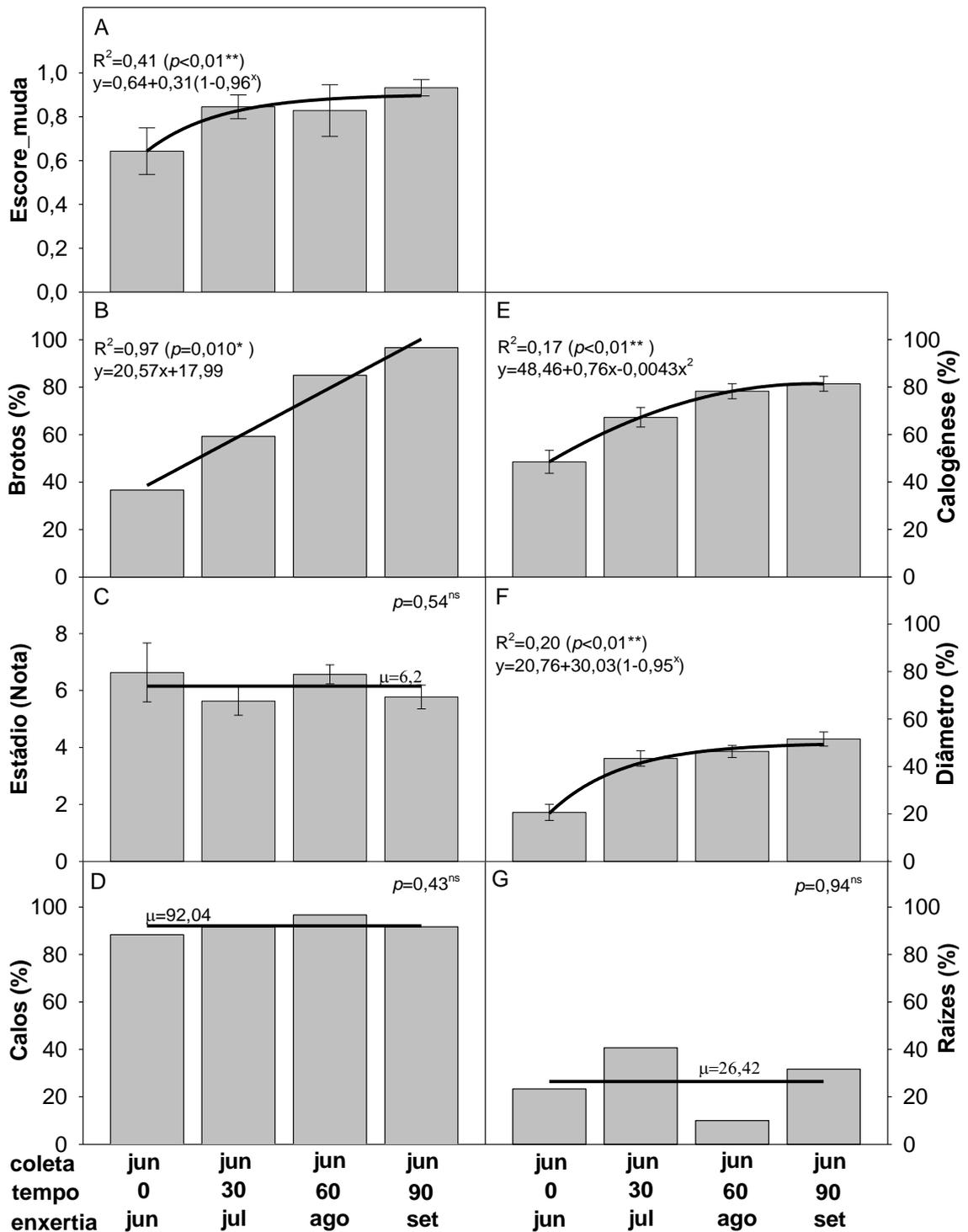


FIGURA 10. Gráfico de barras formado pelos tratamentos aplicados na combinação 'Bordô'/P1103 em 2019: escore de qualidade das mudas (A); percentual de plantas com brotos (B), estágio de brotos (C); percentual de plantas com brotos (D), taxa de formação do calo (E); diâmetro do calo (F) e percentual de plantas com raízes (G). *, ** e ns : significativo a 5%, 1% e não-significativo, respectivamente (f -teste). ²Erro padrão da média.

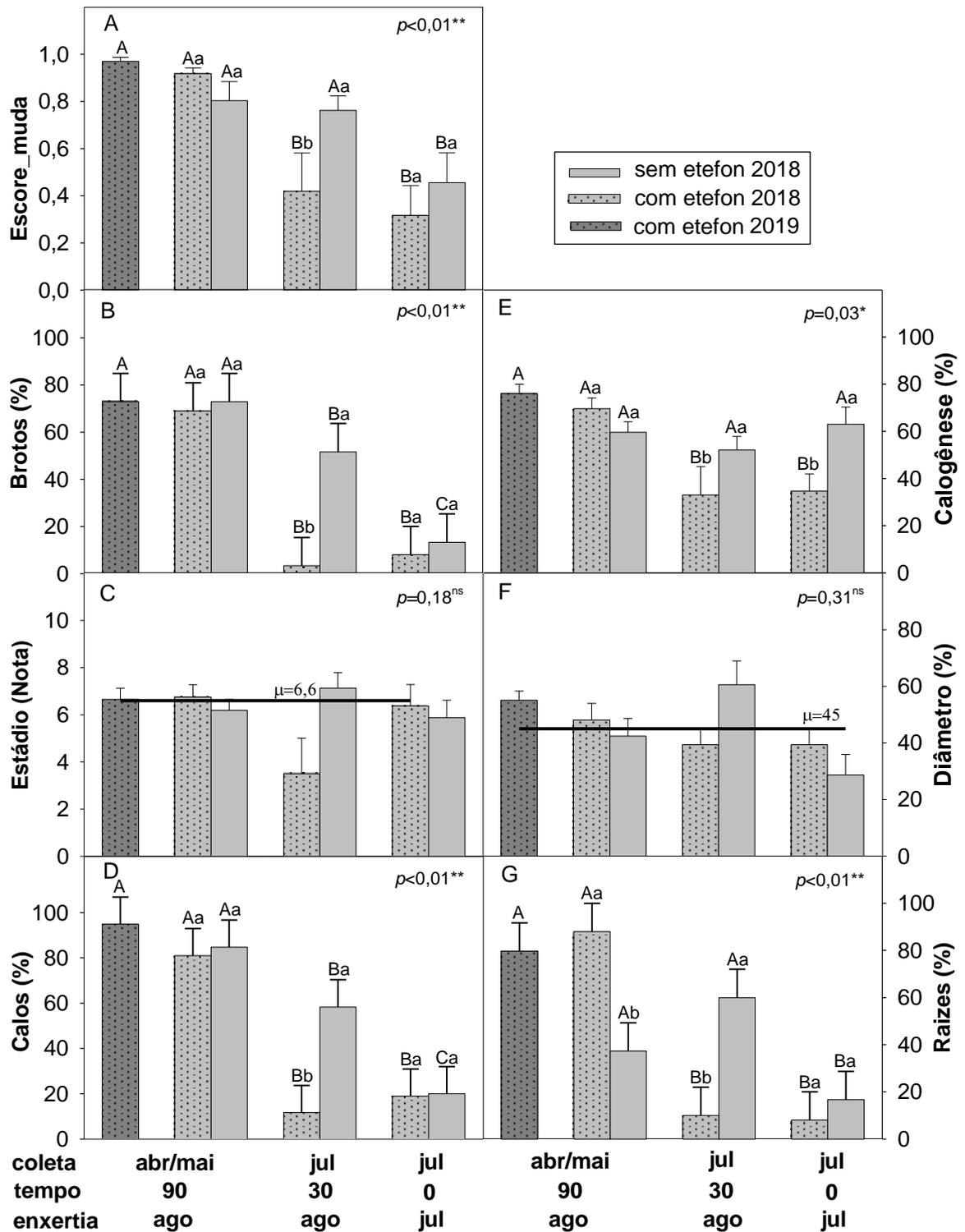


FIGURA 11. Gráfico de barras formado pelos tratamentos aplicados na combinação 'Bordô'/P1103, nos anos de 2018 e 2019: escore de qualidade das mudas (A); percentual de plantas com brotos (B), estágio de brotos (C); percentual de plantas com brotos (D), taxa de formação do calo (E); diâmetro do calo (F) e percentual de plantas com raízes (G). ¹Mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas entre colunas não diferem-se estatisticamente pelos teste de Kruskal-Wallis (A,C,F) e Cochran (B,D,G). *, ** e *ns*: significativo a 5%, 1% e não-significativo, respectivamente. ²Erro padrão da média.

3.4 Discussão

3.4.1 A qualidade das mudas variou entre os anos

Em viveiros, tem sido comum, a associação de determinado ano com a qualidade de mudas. De modo empírico os viveiristas têm essa percepção. Em geral, esta percepção só ocorre na etapa de enraizamento das mudas, quando os fatores pós-enxertia estão confundidos com os fatores de pré-enxertia. Apesar desse confundimento de fatores, essa estratégia de análise pós-enxertia também se encontra na literatura. Regina *et al.* (2012), por exemplo, verificaram que a variabilidade entre anos no número de mudas funcionais após o enraizamento (“pegamento”) está relacionada com as condições meteorológicas durante este período. Contudo, destaca-se que diferenças entre anos já foram detectadas logo após a forçagem nas variáveis fitotécnicas, sem considerar as influências das condições pós-forçagem, como nos resultados de 2019 (Fig.6A.6B). Neste caso, o estágio de desenvolvimento dos brotos foi a variável fitotécnica com o maior peso na diferença entre os anos, sendo superior em 2019 (Fig.6B).

Os resultados obtidos em 2019 poderiam pressupor que os acumulados de HF, foram mais favoráveis quando comparadas a 2017 e 2018. Porém, entre abril e agosto, foi 2018 quem apresentou o maior valor (386HF) dentre os três anos (Fig.5A). Conforme Petri *et al.* (1996) a qualidade do frio (por exemplo, oscilações térmicas ao longo do período hibernal) também interfere no potencial de brotação. Os autores ainda apontam que a flutuação das temperaturas nos meses de inverno é considerada o principal problema para o estabelecimento e superação da endodormência em fruteiras de clima temperado. Em 2017, este feito foi verificado quando, entre maio e agosto, todos os valores de temperatura média foram acima da normal (Fig.4B). Neste caso, esta condição meteorológica possivelmente se refletiu na qualidade das mudas, que apresentaram a maior variabilidade do ‘escore_muda’ (intervalo interquartilico) dentre os três anos (Fig.6C).

Contudo, em 2018, quando as oscilações das temperaturas médias do ar se mantiveram dentro do valor histórico, os valores do ‘escore_muda’ ainda foram menores que em 2019 (Fig.4B). Com isso, destaca-se que o fator isolado de temperatura do ar mensal e HF acumulado no período anterior às coletas não explicaram os contrastes entre anos. Da mesma forma, no que se refere à precipitação, em 2019 foi registrado o menor volume acumulado, em relação a 2017 e 2018, especialmente nos meses que anteveram as coletas (Fig.4A). Chuvas

durante o período de dormência podem remover substâncias inibidoras presentes nas gemas, levando a uma antecipação e maior brotação (Westwood e Bjornstad, 1978). Da mesma forma, o maior turgor celular promovido pelas chuvas no final do período de dormência favorecem a brotação (Hawerth et al., 2010). Ou seja, a menor disponibilidade hídrica, percebida nos dados meteorológicos de 2019, também não justifica o maior 'escore_muda'.

Por outro lado, além dos fatores incidentes durante o período de dormência, conforme Pospescu *et al.* (2014), a ocorrência de estresses durante a safra anterior à coleta de estacas, muitas vezes imperceptíveis, podem se somar ou até mesmo sobrepor o efeito das variáveis meteorológicas. Neste caso, alterações do acúmulo de carboidratos (soma de glicose, frutose, sucrose e amido) da planta matriz podem justificar diferenças de calogênese das mudas (Vršič *et al.*, 2015). No ano de 2019, os acumulados pluviométricos mensais na pré-dormência (jan-mar) mantiveram-se abaixo da normal, especialmente no mês de março (diferente do verificado em 2017 e 2018 que se mantiveram acima da normal neste mês) (Fig.3A). A alta disponibilidade de radiação entre a colheita e a queda de folhas é condição meteorológica favorável para maior acúmulo de carboidratos em folhas fotossinteticamente ativas de videiras (Zufferey *et al.*, 2012). Após a colheita, este fluxo de carboidratos passa a ser direcionado para reservas em sarmentos e raízes (e não para manutenção de novos crescimentos ou maturação de bagas). Desta forma, condições de elevada nebulosidade decorrente de maior número de dias com ocorrência de chuvas (como em 2017 e 2018 em comparação a 2019) podem ter desfavorecido este fluxo. Portanto, no conjunto, fatores ligados às condições meteorológicas nos períodos da pré-dormência podem também ter se refletido em maiores índices fitotécnicos de qualidade das mudas no ano de 2019.

3.4.2 A qualidade das mudas variou em função da cultivar enxertada

Nos trabalhos cotidianos em viveiros é notório que determinada combinação E/PE apresenta desvantagens quanto à quantidade de mudas viáveis produzidas. É prática usual, viveiristas ajustarem a quantidade de mudas enxertadas considerando que esta perda seja natural, pois associam essa resposta exclusivamente à combinação genética envolvida. Neste trabalho, se evidenciou que existiram diferenças entre as combinações utilizadas, porém, o efeito ano teve maior peso, ampliando ou diminuindo esta variação. Corroborando com esta idéia,

Regina *et al.* (2012), enxertando 'Chardonnay' em diversos porta-enxertos, verificaram que o número de mudas viáveis varia entre anos para o mesmo porta-enxerto

Como tendência geral, em 2019, ocorreram as maiores similaridades entre as três cultivares (Fig.7C1), enquanto que, em 2017, os maiores contrastes (Fig.7A1). Neste caso, evidenciou-se de forma direta o macroefeito do baixo acúmulo de HF entre abril e agosto de 2017 (Fig.5A) sobre a qualidade das mudas. Conforme Or *et al.* (2000), em anos com inverno com temperaturas mais elevadas em relação à normal, quando as exigências de HF não são completamente atendidas, diferenças entre cultivares com distintos requerimentos de frio ocorrem, causando grande heterogeneidade de brotação.

De forma mais específica, 'Violeta' e 'Bordô' apresentaram qualidade geral de mudas inferior a 'Riesling'. 'Violeta' teve o comportamento mais distinto dentre as cultivares. Na média dos anos, esta cultivar apresentou maior variabilidade dos desvios entre épocas (Fig.7A1.B1.C1) e o menor 'escore_muda' dentre as três cultivares (Fig.8A). No caso de 'Bordô' as diferenças em relação a 'Riesling' foram menores. Mesmo assim, apenas no ano de 2019 (Fig.7C1), as seis variáveis de qualidade indicaram vantagem de qualidade superior na 'Bordô', nos demais anos, apresentou pelo menos uma variável inferior à 'Riesling' (Fig.7A1.B1). A combinação de variedades híbridas e americanas com porta-enxertos de diversas origens é uma especificidade da viticultura brasileira pouco observada em outras regiões vitícolas no mundo (Camargo *et al.*, 2011). O comportamento observado em 'Violeta' e 'Bordô' pode ser indicativo de maior sensibilidade destas cultivares a algum fator ambiental específico do ano ou até um indício de incompatibilidade. Recentemente, Villa *et al.* (2018) encontraram diferenças de compatibilidade da 'Violeta' entre porta-enxertos, sendo o 'IAC766' mais compatível com este genótipo do que o '420A'. Ainda conforme estes mesmos autores, mudas de 'Bordô' enxertadas em 'IAC 766' apresentaram maior número de plantas formadas no vinhedo do que quando enxertadas em '420A'. De modo geral, os autores, associam estes resultados em função do 'IAC 766' induzir maior vigor na copa, mas não se pode descartar que este porta-enxerto apresenta na sua genealogia, maior número de parentais favorecendo sua compatibilidade.

Diferenças de qualidade de mudas de videiras associada à origem genética da cultivar-copa ou do porta-enxerto já são conhecidas (Pospecu *et al.*, 2014; Vršič

et al., 2015). Em geral, o efeito do porta-enxerto tende a determinar maior impacto sobre a modificação de parâmetros fisiológicos na cultivar-copa, especialmente àqueles relacionados ao vigor (Jones *et al.* 2009, Santarosa *et al.*, 2016). Contudo, Tandonnet *et al.* (2010) evidenciaram que as interações entre enxerto e porta-enxerto são cruzadas e dependentes da idade. Em plantas jovens, a cultivar-copa também exerce influência sobre o porta-enxerto, especialmente no controle da partição de biomassa entre brotos e raízes. Os resultados obtidos indicam que até o momento, estudos relacionados à interação enxerto/porta-enxerto nas combinações testadas neste trabalho ainda são superficiais, cabendo um entendimento fisiológico, bioquímico e molecular mais aprofundado.

Outro fator associado às diferenças entre cultivares refere-se à época de coleta em interação ao frio artificial acumulado em câmara de armazenagem até o momento da enxertia. Esta é a estratégia de coleta adotada pelos viveiristas no Sul do Brasil, mas o confundimento entre estes dois fatores acentua a percepção de que a variação da qualidade de mudas para uma mesma cultivar é aleatória entre anos. Neste trabalho, apesar deste confundimento, foi identificado um padrão de resposta do 'escore_muda' em função do tratamento época de coleta mais exposição ao frio artificial, o qual foi dependente da cultivar enxertada (Fig.8C). Estes padrões, especulados a seguir, podem estar relacionados com os contrastes genéticos de requerimento em HF para indução e superação da dormência ou de soma térmica (temperatura mínima basal para início da brotação).

'Violeta' indicou uma tendência de maior exigência em HF, pois a coleta em final de agosto e sem a aplicação do frio artificial determinou a queda mais acentuada do 'escore_muda', nos três anos (Fig.8C). Esta cultivar tem sido caracterizada como de ciclo precoce (Camargo *et al.*, 2005), mas não se dispõe de nenhum registro sobre suas demandas em HF. Apesar disso, Mariani *et al.* (2019) classificam 'Violeta' com requerimento de soma térmica de 215 graus-dia no período da poda até a brotação, o que é maior do que a 'Bordô' (147 graus-dia).

'Bordô' apresentou maior variabilidade do 'escore_muda' entre anos (em nenhum o padrão foi o mesmo) (Fig.8C). Quanto ao requerimento de frio, na região da Serra Gaúcha, esta cultivar tem sido classificada como de dormência leve ou superficial, com uma demanda de 50 a 70 HF para indução e superação da endodormência (Peruzzo *et al.*, 2014). Além disso, conforme Anzanello e Christo (2019) nesta região foi evidenciado que a temperatura basal de 'Bordô' está em

torno de 4,4°C (abaixo de 7,2°C, utilizada como referência para videira). Assim, esta cultivar provavelmente atingiu sua demanda de HF de forma muito antecipada e, devido a sua baixa temperatura mínima basal, torna-se mais responsiva às oscilações térmicas hibernais.

‘Riesling’, não apresentou muitas variações do padrão entre épocas ao longo dos anos, destacando a coleta de julho com os maiores escores nos três anos (Fig.8C). ‘Riesling’, apesar de não ter dados de exigência em HF ajustados localmente, Amaral *et al.* (2009) na região da Campanha, classificaram este genótipo como uma cultivar de ciclo precoce, similar à ‘Chardonnay’, que por sua vez foi classificada por Anzanello *et al.* (2018) como um genótipo que demanda 136 HF para indução e superação da endormência. Além disso, conforme Zapata *et al.* (2015) ‘Riesling Itálico’ apresenta uma temperatura basal de 11,8°C. Assim, a combinação de maior exigência em HF e alta temperatura mínima basal, determinou um estado de endodormência mais estável e profundo nesta cultivar.

3.4.3 A exposição do material vegetal ao frio artificial incrementou a qualidade das mudas nas coletas entre o início e a máxima endodormência

Em viveiros, busca-se a condição em que a qualidade da muda, independente da cultivar, seja a mais elevada e estável entre os anos. Porém, conforme já explicitado, o confundimento entre época de coleta, exposição ao frio artificial e comportamento da cultivar, causa a falta de um ajuste fitotécnico claro. Neste trabalho, pôde-se evidenciar que a exposição ao frio artificial foi uma estratégia capaz de minimizar as diferenças entre anos e entre combinação de genótipos em cada época de coleta de material vegetal. As coletas com exposição ao frio artificial em junho e julho apresentaram a tendência de maior escore (Fig.7A2,B2,C2). Na medida em que houve atraso na época de coleta e, conseqüentemente menor exposição ao frio artificial, diferenças entre cultivares e anos tornaram-se mais evidentes (Fig.8C). Conforme Koussa *et al.* (1994) o frio artificial é uma condição uniforme para que ocorra a diminuição gradual dos níveis de ABA nas gemas de videira. Aumentos nos níveis de ácido abscísico (ABA) são fortemente relacionados aos processos de adaptação das plantas ao frio (Noriega e Pérez, 2017; Vergara *et al.*, 2017). Para que o crescimento da planta ocorra, seus níveis devem ser mantidos basais depois de transcorrido o período do estresse

térmico (Zheng *et al.*, 2018). Portanto, para as gemas, essa condição artificial constante de frio é muito mais favorável para a superação do estado de dormência do que a condição de campo no inverno. As temperaturas elevadas no campo podem ocorrer de forma alternada aos períodos de frio, gerando atrasos e irregularidades na brotação (Anzanello *et al.*, 2014). Assim, apesar de cultivares-copa indicarem que seu padrão de resposta à interação época de coleta mais frio artificial ser específico, o benefício deste frio sobre a qualidade das mudas, pode ser considerado geral a todas.

Apesar do benefício do frio artificial ser observado em coletas realizadas entre final de junho e julho (associadas a 60 e 30 dias de exposição ao frio artificial, respectivamente) em detrimento à coleta em agosto (sem exposição a este frio), na logística do viveiros no Sul do Brasil, coletas seguidas de armazenamento podem ser realizadas desde o início da endodormência. Neste caso, detalhou-se o benefício do frio artificial, dentro de três momentos (estabelecidos de acordo com a fase aproximada da dormência ao longo dos meses): final de junho até final de julho (como de máxima endodormência), em final de maio (início) e entre final de julho até final agosto (final).

Nas coletas de final de junho até final de julho (máxima endodormência), ocorreu efeito positivo do 'escore_muda' com a aplicação de 60 dias de frio artificial (em torno de 1.440HF) (Fig.9B). Porém, a intensidade desta resposta foi definida pelo efeito ano em interação com a época de coleta. Enquanto que, na coleta de julho de 2018 o incremento máximo proporcionado pela exposição ao frio foi de 49% (Fig.9B1), em 2019 este incremento ocorreu apenas em junho e de 25% (Fig.9B2). Contudo, destaca-se que, apesar deste incremento se diferenciar entre anos, sob exposição ao frio artificial, os valores absolutos se mantiveram em níveis similares entre épocas e anos (Fig.9A2). Estas respostas estão de acordo com Herter *et al.* (2001), os quais salientam que plantas provenientes de diferentes situações térmicas de campo, quando submetidas a longos períodos de frio artificial, tendem a uniformizar eventuais diferenças quanto ao seu potencial de brotação. Isto se deve ao efeito sinérgico entre baixas temperaturas e os níveis de ABA controlando a expressão dos fatores de transcrição promotores da adaptação ao frio (Vergara *et al.*, 2017; Rubio *et al.*, 2019). Ou seja, o material proveniente do campo, quando coletado durante sua endodormência, pode apresentar elevados níveis de ABA dependendo das condições do ano (Koussa *et al.*, 1994). Conforme

estes autores, ao expor estacas coletadas ao frio intenso de câmara ocorre um pico na concentração do ABA. Posteriormente, e de modo gradativo, a exposição ao frio promove o catabolismo do ABA, devido ao aumento de genes responsáveis pela sua esterificação, especialmente pela atividade da catalase (Zheng *et al.*, 2018). Portanto, após 60 dias de frio, em qualquer época de coleta, os níveis de ABA possivelmente se encontravam mais baixos, de modo que, durante a exposição às maiores temperaturas da forçagem rapidamente houve a indução dos processos metabólicos relacionados à enxertia.

Nas coletas em final de maio (início da endodormência), benefícios da exposição ao frio artificial (90 dias) também foram evidenciados. O efeito foi independente do ano, mantendo o 'escore_muda' similar e elevado tanto em 2018 como 2019 (Fig.9C). No que se refere à qualidade de mudas em coletas antecipadas, Maroli *et al.* (2014) também reportaram maiores valores de "pegamento" em 'Bordô' no mês de maio quando comparadas com agosto, mesmo sem submeter o material vegetal ao frio artificial. Conforme Biasi *et al.* (2010), nestas condições, possivelmente a entrada em endodormência ocorre pela mudança no fotoperíodo e não pela indução ao frio. Neste caso, o processo de dormência foi ativado, mas ainda não aprofundado (que ocorre nos meses seguintes do outono/inverno) sendo induzido pela exposição ao frio artificial. Outro fator que também pode incidir sobre a qualidade do material vegetal e que beneficia a coleta antecipada refere-se ao efeito do ano sobre a planta matriz. Este foi evidenciado em 2018, quando o benefício proporcionado pela exposição ao frio artificial se perdeu nas demais épocas de coleta, diferentemente de 2019 que se manteve (Fig.9C). Em 2018, condições desfavoráveis durante o período de pré- e dormência podem ter favorecido a queda do 'escore_muda' em relação a 2019 ao longo das épocas de coleta. Portanto, a desfolha antecipada (em início de abril) foi realizada no momento de maior acúmulo de biomassa e, possivelmente, elevado acúmulo de carboidratos. Após esta coleta, efeitos do ano passaram a influenciar na qualidade deste carboidrato reduzindo os valores na coleta subsequentes em 2018.

Nas coletas entre final de julho até final agosto (final da endodormência), a aplicação de 60 dias de frio artificial não incrementou os valores do escore nos dois anos (Fig.9B). Anzanello e Christo (2019) estabelecem que neste período de ago/set, além de ter condições térmicas para mais acúmulo de HF, também ocorre

o aumento gradativo da soma térmica, a partir da superação da temperatura mínima basal de cada genótipo. Apesar de não haver trabalho específico para 'Bordô', o resultado obtido corrobora com Biasi *et al.* (2010) em 'Niágara Rosada' (também *Vitis labrusca*), cujas gemas coletadas em agosto e submetidas a 1.440 horas de frio artificial não favoreceram a brotação, pois nesta época a cultivar já tinha suprido a campo as demandas de HF. Adicionalmente, outro fator que pode estar contribuindo com esse desfavorecimento do frio artificial é a maior turgescência natural das gemas e estacas que ficam mais tempo nas plantas matrizes. A partir do momento que a exigência em frio é atendida e as temperaturas do ar se elevam os níveis dos compostos inibidores de crescimento (ex.: ABA, EROS, etc) vão diminuindo e os promotores vão aumentando (Albuquerque e Albuquerque, 1982). A planta, ao recuperar sua atividade metabólica, inicia intensa absorção da água do solo através das raízes, aumentando também o influxo hídrico através dos seus tecidos (Hawerth *et al.*, 2010). Assim, durante a forçagem, estes materiais vegetais (estacas e gemas) apresentam condição hídrica e solubilidade de açúcares mais favoráveis às reações metabólicas de brotação e calogênese.

3.4.5 Sem exposição do material vegetal ao frio artificial a qualidade das mudas variou entre épocas

Apesar dos benefícios da exposição do frio artificial no período do início a máxima endodormência para a qualidade das mudas, a enxertia imediatamente após a coleta (sem armazenamento em câmara frigorífica) ainda é uma realidade no setor viveirista. Em regiões sem histórico de ocorrência de geadas durante o enraizamento das mudas, opta-se por esta prática desde o mês de junho. Isto é realizado como forma de otimizar a utilização da câmara frigorífica, quando não está dimensionada para armazenagem de todo o material vegetal disponível no jardim clonal. O efeito que esta prática traz sobre a qualidade das mudas de 'Bordô' não é referenciado na literatura. De modo geral, por este trabalho, se observou que, houve um incremento da qualidade das mudas com o atraso da época coleta de junho a agosto (Fig.9B).

Os menores valores de escore verificados em julho de 2018 (Fig.9B1) e junho de 2019 (Fig.9B2), quando comparados à agosto, podem ser justificados a partir dos trabalhos de evolução do acúmulo dos compostos repressores da atividade metabólica, em especial o ABA, que condicionam um estado de

dormência. Sabe-se que existe uma relação entre o metabolismo e o catabolismo do ABA durante o período da dormência da videira. Conforme Zheng *et al.* (2018), na medida em que estacas de videiras são expostas ao frio ocorre o aumento dos níveis do ABA até que um pico seja atingido. A partir deste ponto ocorre a ativação dos genes de catabolismo do ABA (*VvA8H-CYP707A4*) diminuindo a expressão dos seus genes de biossíntese (*VvNCED1*). Deste modo, nas coletas em jul/2018 e jun/2019, possivelmente os níveis de ABA ainda estavam elevados nas estacas de 'Bordô', mas sem que o processo de catabolismo estivesse plenamente ativado.

Cabe destacar que, entre anos, o frio acumulado em jul/2018 foi inferior a jul/2019 (84 e 142 HF, respectivamente) e inferior ao histórico (126HF) (Fig.5A), resultando no 'escore_muda' menor em 2018 (0,37) que em 2019 (0,87) (Fig.9B). Por outro lado, em agosto, o frio acumulado foi similar em 2018 e 2019 (142 e 145 HF, respectivamente) e acima do histórico (78HF) (Fig.5A). Porém, o 'escore_muda' ainda foi menor na coleta de ago/2018 (0,50) que em ago/2019 (0,83) (Fig.9B). Neste caso, foi o frio acumulado de julho a agosto (226 e 287 HF em 2018 e 2019, respectivamente) que parece estar mais associado a esta variação. Adicionalmente, ressalta-se que, em jul/2019 e ago/2019 o HF acumulado nestes meses foi acima do histórico e semelhante entre eles (142HF) (Fig.5A). Esta condição refletiu-se no mesmo 'escore_muda' (0,84 e 0,83, em 2018 e 2019, respectivamente) (Fig.9B). Ressalta-se, porém que, para 'Bordô' com 70HF já é possível obter a superação da dormência (Peruzzo *et al.*, 2014). De qualquer forma, nestes contrastes, o efeito do frio de campo foi aceito, de modo que, a qualidade das mudas seguiu a premissa definida por Erez (2000) em que condições com insuficiente acúmulo de HF promovem atrasos e baixos índices na brotação de gemas vegetativas e floríferas. Desta forma, aparentemente, nos dois anos analisados, o frio acumulado no período iminente à coleta foi mais constante, podendo ser considerado mais importante que o total de frio acumulado desde abril.

3.4.6 O tempo de exposição do material vegetal ao frio artificial afetou a qualidade das mudas nas coletas do período de máxima endodormência

No Sul do Brasil, de modo geral, a coleta realizada no período de máxima endodormência é aquela que possibilita ao viveirista o maior escalonamento de períodos de exposição ao frio artificial. Por exemplo, coletando-se em final de junho,

pode-se escalonar o armazenamento em 30, 60 e até 90 dias, mantendo-se o plantio dentro da época preferencial a partir de agosto (BRASIL, 2019). Ao contrastar a amplitude de exposição ao frio artificial nesta época em 'Bordô', permitiu-se detalhar seu efeito sobre cada variável fitotécnica da qualidade da muda (brotação, enraizamento e calogênese).

O percentual de plantas brotadas foi a variável que mais respondeu a ocorrência de frio, aumentando 62% após aplicação de 90 dias (2.160HF) (Fig.10B). De maneira geral, destaca-se que o benefício obtido com o frio artificial nas mudas foi superior ao efeito necessário para superação da dormência de gemas. Teoricamente, no caso de 'Bordô', em que o máximo de brotação foi obtido com 200HF por Peruzzo *et al.* (2014), oito dias em câmara frigorífica já deveriam ser suficientes para se obter um resultado semelhante. Esta condição seria atingida na coleta em final agosto, quando as estacas coletadas já acumulavam 288HF desde abril na média dos três anos (Fig.4B). Ou seja, HF suficiente para superação da endodormência. Porém, a dinâmica da brotação de gemas enxertadas provavelmente difere de gemas forçadas a brotar quando não-enxertadas (auto-enraizadas). Na região da enxertia, a cascata de sinalização desencadeia uma reposta de estresse, especialmente com o aumento dos níveis de ABA (Gijsegem *et al.*, 2017) e de compostos fenólicos (Canas *et al.*, 2015). Adicionalmente, estacas de videira durante a endormência apresentam elevados níveis de biossíntese do ABA (Noriega e Pérez, 2017). Assim, dependendo da época de coleta ou do tempo de exposição ao frio artificial, é esperado que as estacas ainda apresentem elevados níveis de ABA no momento da enxertia. Estes níveis endógenos atuando em sinergia com os níveis desencadeados pelo processo de enxertia em si poderão, por consequência, restringir a morfogênese da muda. Assim, o tempo de 90 dias, possivelmente, permitiu reduzir os repressores fitohormonais a níveis que não restringissem a brotação por ocasião da exposição das estacas enxertadas ao calor da forçagem.

Nas variáveis da calogênese, a exposição ao frio também promoveu benefícios na taxa de formação e no diâmetro de crescimento dos calos na região de enxertia (Fig.10E e 10F, respectivamente). Neste experimento, altos incrementos nas taxas de formação e diâmetro de crescimento de calos, em relação à condição sem frio, foram obtidos a partir dos 60 dias de exposição (38% (Fig.10E) e 54% (Fig.10F), respectivamente). De certo modo, este resultado demonstra que

houve efeito positivo do frio tanto no enxerto quanto no porta-enxerto. Tal evidência é corroborada pelo fato de que existe comprovada interação entre enxerto e porta-enxerto sobre a calogênese em nível fisiológico, morfológico e molecular (Vahdati *et al.*, 2010; Kösea *et al.*, 2015; Santarosa *et al.*, 2016). Cabe ainda destacar que, atualmente, utiliza-se como critério de eficiência de forçagem o percentual de mudas com brotação e presença de calos (Regina *et al.*, 2002a). No presente trabalho, o percentual de plantas com calos não respondeu ao tempo de exposição, mantendo-se elevado e com média de 92% (Fig.10D). Porém, mudas com presença de calos, mas classificadas como de má formação na pós-forçagem, possivelmente não irão prover mudas funcionais durante a etapa de enraizamento (Hunter *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2013). Assim, o tempo de 60 dias, além de viabilizar elevado percentual de plantas com calos, permitiu também, a obtenção de calos completos (78% de formação (Fig.10E)). Este resultado evidencia que mais importante que a simples presença de plantas com calos na pós-forçagem é a uniformidade da sua formação.

Por outro lado, o enraizamento não foi influenciado pelo tempo de exposição, mantendo-se com valores baixos (26%) (Fig.10G). Diferente resultado foi obtido por Keeley *et al.* (2003) com a aplicação de 48 dias de exposição a 5°C no enraizamento de híbridos de *Vitis champinii*, levando ao aumento do número de raízes. Por outro lado, Alley e Koyama (1981) com estacas de diversas cultivares de videiras armazenadas por um ano após a coleta, não obtiveram diferenças de enraizamento, quando comparado ao plantio sem exposição ao frio. Porém, cabe ressaltar que, estes resultados derivam de enraizamentos realizados em solo e não dentro das condições realizadas no presente trabalho. Durante a forçagem, a produção radicial foi baixa, especialmente pela elevada umidade na região basal das estacas, propiciada pela utilização da vermiculita umedecida como substrato. A condição de elevada umidade, deve ser mantida para que haja a hidratação do material vegetal e redução dos inibidores de enraizamento como ABA e GA, em situações de deficit hídrico (Gökbayrak *et al.*, 2010). Contudo, sabe-se que a indução radicial nesta etapa é necessária, pois favorece o dreno do fluxo basipetal de auxinas dos meristemas apicais para esta região (Enders e Streider, 2015). Além disso, a formação de calo basal nesta etapa favorece a defesa física da planta contra a infecção por patógenos de solo na etapa de viveiro (Diaz *et al.*, 2009). Portanto, testes com substratos de forçagem que mantenham elevada umidificação

na base das estacas, mas com oxigenação satisfatória, podem alterar os resultados obtidos.

3.4.7 A antecipação da época de coleta foi possível pela utilização de etefon

A coleta antecipada em maio apresentou altos escores nos dois anos, comprovando ser uma estratégia recomendada para minimizar os efeitos do ano (Fig.9C). Da mesma forma, do ponto de vista da logística do viveiro, permite o escalonamento da coleta e da enxertia com maior número de mudas plantadas dentro do período preferencial. Contudo, nas condições do Sul do Brasil e nesta época, dependendo da cultivar, as plantas podem apresentar muitas folhas e crescimento apical ativo. Conforme Mandelli *et al.* (2003), para 'Riesling', a queda completa das folhas ocorre, em média, no final de junho na Serra Gaúcha. No caso de 'Bordô' esta queda se completa no final de maio, na média dos anos. No presente trabalho, foram testadas aplicações de etefon em abril, buscando (conforme Fracaro e Boliani, 2001) uma desfolha precoce, a uniformização da lignificação dos ramos, o escalonamento da poda e o rendimento da operação de poda. Adicionalmente, eventuais benefícios sobre a qualidade de mudas pós-forçagem foram analisados.

De forma geral, o único benefício fisiológico observado sobre a qualidade das mudas, com a utilização de etefon, foi sobre o percentual de enraizamento das plantas na coleta antecipada (Fig.11G). Em videiras, este efeito já foi relatado por Mathias (2015) que obtiveram maiores taxas de enraizamento em 'SO4' após aplicações foliares. O etefon tem efeito predominante na rota do etileno, estimulando sua biossíntese (Rossi *et al.*, 2008). Dentre suas funções, Nanda e Melnyk (2018) destacam a iniciação radicial, porém, podendo exercer efeitos positivos ou negativos, dependendo do sítio de ação e idade do órgão em que atua. Conforme Rossi *et al.* (2008), tecidos das raízes de mudas tratadas com etefon apresentaram reduzido crescimento primário (alongação), mas aumento no crescimento secundário (engrossamento). Porém, durante a enxertia, o etileno também interage com outros hormônios, dentre eles as auxinas, favorecendo divisões celulares (Nanda e Melnyk, 2018) e, conseqüentemente, aprimorar a calogênese de mudas. Contudo, na análise das demais variáveis constituintes do escore, não se observou nenhuma resposta significativa com a utilização de etefon.

Na coleta antecipada, tanto na condição com ou sem a presença deste produto, os valores das variáveis relacionadas a brotação e calogênese foram similares ao controle e elevados em relação às demais épocas (Fig.11).

No que se refere ao manejo do etefon no Sul do Brasil, com foco em coleta de materiais vegetais, não há uma definição na literatura quanto ao ajuste da tecnologia. A partir do teste realizado para coletas antecipadas, sugere-se o mesmo manejo utilizado na viticultura do Nordeste brasileiro. Nesta região, o etefon é aplicado para o encerramento do ciclo, em conjunto com restrição na disponibilidade de água para manter a planta sem brotar (Camargo, 2004). Posteriormente, com a poda, início da irrigação e aplicação de cianamida hidrogenada, ocorre novo ciclo. Nas condições deste trabalho, na época escolhida para aplicação do etefon, observou-se interação entre os efeitos do etileno com as condições meteorológicas, resultando em indução e imediata superação da endodormência. Em 2018, houve a entrada de uma frente fria e o acúmulo de 33 HF em maio, após a aplicação do produto (em abril), mas enquanto as plantas ainda apresentavam a presença de folhas. Posteriormente, após este acumulado de HF, ocorreu sequencia de dias com temperaturas máximas acima de 20°C (Fig.4B), suficientes para acumular soma térmica, induzindo a brotação nas plantas matrizes antes de ter ocorrido a desfolha completa. Neste caso, foi necessária a reaplicação do produto, havendo então nova desfolha e estabelecimento da endodormência.

Já em 2019, à fim de evitar o efeito verificado em 2018, optou-se pela soma das duas doses de 2018, o que acarretou na imediata desfolha das plantas. Com o aumento da concentração do etileno na planta, a desfolha ocorreu com maior intensidade e mais antecipada do que em 2018. Apesar desta variação no modo de aplicação, a concentração total de 5.040 ppm, utilizada tanto em 'Bordô', quanto em 'Paulsen1103' foi mantida. Cabe salientar, que as mudanças na utilização do insumo entre 2018 e 2019, não tiveram efeito sobre os resultados da coleta antecipada (Fig.9C e Fig.11). Destaca-se ainda que, a recomendação de doses varia conforme a região, cultivar e época/sistema de poda, desde 1.500 ppm (Abreu *et al.*, 2016) à 9.000 ppm (Pereira e Fracaro, 2004). Além disso, não existem indicações de concentrações e épocas de utilização do etefon para porta-enxertos de *Vitis* spp. O tratamento repetido em 2019 validou de forma plena o resultado de 2018 (Fig.11), confirmando os benefícios de uso do etefon na coleta antecipada. Portanto, assim como no semi-árido, nas condições testadas por este trabalho,

etefon não ativou a endodormência sozinho (pois esta é imposta pelo fotoperíodo e, principalmente, pelos primeiros frios de outono), mas sim atuou como coadjuvante, mimetizando uma condição de estresse biótico ou abiótico, onde forçou a queda de folhas e a antecipação da maturação dos tecidos com consequente paralisação do crescimento.

Outro contraste testado em 2018 se refere ao efeito do etefon aplicado em abril sobre as coletas subsequentes realizadas ao longo da endodormência. Com o atraso da coleta das estacas, em julho (com exposição de 30 dias ao frio artificial), houve impacto negativo do etefon sobre a qualidade da muda (Fig.11A). Nestas mudas, o tratamento de etefon promoveu um efeito deletério sobre a calogênese, brotação e enraizamento. Conforme Sun *et al.* (2016) no início da dormência, o etileno favorece o estado de dormência das videiras em resposta à diminuição das temperaturas do ar. De forma aditiva, na medida em que o inverno avança a síntese de ABA também aumenta levando ao aprofundamento da dormência (Zheng *et al.*, 2018; Rubio *et al.*, 2019). Desta forma, plantas tratadas com etefon em abril possivelmente já vinham com valores elevados destes compostos repressores ainda em julho. Após a coleta das estacas e exposição ao frio artificial (de intensidade superior), os níveis destes repressores acentuaram-se ainda mais. Conforme Iqbal *et al.* (2017), durante a senescência foliar, etileno tem regulação antagonística sobre auxinas, paralisando o desenvolvimento foliar. Neste caso, o período de 30 dias possivelmente não foi suficiente, para catálise destes repressores, resultando em mudas de baixa qualidade. Já na coleta de julho, este efeito diminuiu, porém ainda apresentou danos sobre taxa de calogênese (Fig.11E). Portanto, é inerente a estratégia de utilização deste insumo, a coleta de estacas imediatamente após a desfolha das plantas, garantindo um período prolongado de armazenamento em câmara frigorífica.

3.5 Conclusões

Mudas da cultivar Violeta enxertadas em 'P1103' têm a qualidade fitotécnica negativamente afetada pelo atraso da época. Já 'Bordô' é mais variável entre épocas e anos enquanto que 'Riesling' é mais estável.

Na coleta entre abril e maio é possível obter benefícios do frio artificial sobre a qualidade fitotécnica de mudas. Já em final de agosto, as plantas se mostram insensíveis. Entre junho e julho, nos anos que as condições de campo não

favorecem a formação da muda, a exposição ao frio artificial incrementa na qualidade fitotécnica.

O percentual de plantas brotadas é mais dependente do tempo de exposição ao frio artificial (90 dias), seguido pela taxa de calogênese da enxertia (60 dias). Já o enraizamento não apresenta resposta positiva ao aumento do tempo de exposição.

A utilização do etefon associada à coleta entre final de abril e maio, seguido por 90 dias de armazenamento incrementa o percentual de enraizamento. Porém, quando a coleta ocorre em final de julho, as aplicações de etefon afetam negativamente a qualidade das mudas, especialmente a taxa de calogênese.

3.6 Referências bibliográficas

ABREU, C. M. de *et al.* A. Etefon e épocas de poda no crescimento de videira rústica. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n. 6, p. 829-835, 2016.

ALLEY, C. J.; PETERSON, J. E. Grapevine propagation. IX. Effects of temperature, refrigeration, and indole butyric acid on calosing, bud push, and rooting of dormant cuttings. **American Journal Enology and Viticulture**, Davis, v. 28, n. 1, p. 1-7, 1977.

AMARAL, L. I. V. *et al.* Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.

ANZANELLO, R. *et al.* Bud dormancy in apple trees after thermal fluctuations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 6, p. 457-464, 2014.

ANZANELLO, R.; FIALHO, F. B.; SANTOS, H. P. dos. Chilling requirements and dormancy evolution in grapevine buds. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 42, n. 4, p. 364-371, 2018.

ANZANELLO, R.; CHRISTO, M. C. de. Temperatura base inferior, soma térmica e fenologia de cultivares de videira e quivizeiro. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 3, n. 18, p. 313-322, 2019.

CAMARGO, U. A. Técnicas de produção vitícola com ciclos sucessivos em condições tropicais. *In*: WORKSHOP INTERNACIONAL DE PESQUISA, 2004, Petrolina. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 85-95.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; NACHTIGAL, J. C. **BRS Violeta**: nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 8 p. (Comunicado Técnico, 63).

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. especial, p.144-149, 2011.

CELIK, H. The effects of different grafting methods applied by manual grafting units on grafting success in grapevines. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 24, p. 499-504, 2000.

EICHORN, K. W.; LORENZ, D. H. Phaenologische entwicklungsstadien der rebe nachrichtemblaest. **Pflanzenschutzdienstes**, Braunschweig, v. 29, p. 119-120, 1977.

ENDERS, T. A; STRADER, L. C. Auxin activity: past, present, and future. **American Journal Botanic**, Connecticut, v. 102, n. 2, p. 180-196, 2015.

EREZ, A. Bud dormancy; phenomenon, problems and solutions in the tropics and subtropics. *In*: EREZ, A. (Ed.) **Temperate fruit crops in warm climates**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 17-48.

FRACARO, A. A.; BOLIANI, A. C. Efeito do Etefon em videira 'Rubi' (*Vitis vinifera* L.), cultivada na região Noroeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 510-512, 2001.

GIJSEGEM, F. V. Manipulation of ABA content in *Arabidopsis thaliana* modifies sensitivity and oxidative stress response to dickeya dadantii and influences peroxidase activity. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v. 8, n. 456, p. 1-13, 2017.

GÖKBAYRAK, Z. *et al.* Best duration for submersion of grapevine cuttings of rootstock 41B in water to increase root formation. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 8, n. 3-4, p. 607-609, 2010.

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

HAWERROTH, F. G. H. *et al.* **Dormência em frutíferas de clima temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 56 p. (Documentos, 310).

HELPER, G. A. *et al.* Chemostat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 475-579, 2015.

HERTER, F. G. *et al.* Efeito do frio na brotação de gemas de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick, em Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 261-264, 2001.

IQBAL, N. *et al.* Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v. 8, n. 475, p. 1-19, 2017.

JONES, T. H. *et al.* Effects of novel hybrid and traditional rootstocks on vigour and yield components of Shiraz grapevines. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v.15, p. 284-292, 2009.

JUNGES, A. H. Caracterização climática da temperatura do ar em Veranópolis, Rio Grande do Sul. **Agrometeoros**, Passo Fundo, v. 26, n. 2, p. 299-306, 2018.

KEELEY, K.; PREECE, J. E.; TAYLOR, B. H. Increased rooting of 'Norton' grape cuttings using auxins and gibberellin biosynthesis inhibitors. **HortScience**, Alexandria, v. 38, n. 2, p. 281-283, 2003.

KOUSSA, T.; BROQUEDIS, M.; BOUARD, J. Importance de l'acide abscissique dans le développement des bourgeons latents de vigne (*Vitis vinifera* L. var. Merlot) et plus particulièrement dans la levée de dormance. **Vitis**, Siebeldingen, v. 33, p. 63-67, 1994.

KUHN, G. B. **Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado**: Preparação da muda. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. (Sistemas de Produção, 4). Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/muda.htm>> Acesso em: 12 jan. 2020.

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

LAJEUNESSE, M. On the meta-analysis of response ratios for studies with correlated and multi-group designs. **Ecology**, Washington, v. 92, p. 2049-2055, 2011.

MANDELLI, F. *et al.* Fenologia da videira na Serra Gaúcha. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 9, n. 1-2, p. 129-144, 2003.

MARIANI, J. A.; NAVA, G. A.; PAULUS, D. Phenology and thermal requirements of grapevine cultivars in Dois Vizinhos, Paraná State, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 49, n. 9, e20180328, 2019.

MAROLI, L. *et al.* Produção de mudas de videira cv. Bordô/Paulsen 1103 pela enxertia de mesa com forçagem. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 673-679, 2014.

MATHIAS, L. R. **Auxina e etileno no enraizamento do porta-enxerto 'SO4'**. 2015. 42 f. Trabalho de Conclusão (Graduação) – Curso de Bacharelado em Enologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Pampa, Dom Pedrito, 2015.

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

NASCIMENTO, M. B. **Efeitos de vírus sobre características agronômicas em vinhedos, incidência viral em matrizeiros e caracterização de isolados de**

vírus de videira, roseira e pessegueiro. 2015. 75 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

OR, E. *et al.* Changes in endogenous ABA level in relation to the dormancy cycle in grapevines grown in a hot climate. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Warwick, n. 75, v. 2, p. 190-194, 2000.

NORIEGA, X.; PÉREZ, F. J. ABA biosynthesis genes are down-regulated while auxin and cytokinin biosynthesis genes are up-regulated during the release of grapevine buds from endodormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**, Van Godewijckstraat, v. 36, n. 4, p. 814-823, 2017.

PETRI, J. L. *et al.* **Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado**. Florianópolis: Epagri, 1996. 110p. (Boletim Técnico, 75).

PEREIRA, F. M.; FRACARO, A. A. Efeito do etefon na qualidade da uva 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L.), produzida na entressafra, na região de Jales-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 254-257, 2004.

PERUZZO, N. A. *et al.* Necessidade de horas de frio para superação da endodormência em cultivares *Vitis Labrusca* L. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 4., 2014, Bento Gonçalves, RS. **Anais...** Bento Gonçalves: IFRS, 2014. 5p.

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

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

REGINA, M. A.; SOUZA, C. R.; DIAS, F. A. N. Propagação de *Vitis* spp. pela enxertia de mesa utilizando diferentes porta-enxertos e auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 897-904, 2012.

ROSSI, V. L.; AMARANTE, C. V. T.; FLEIG, F. D. Crescimento e qualidade de mudas de pinus taeda l. submetidas à poda química de raízes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 4, p. 435-442, 2008.

RUBIO, S.; NORIEGA, X.; PÉREZ, F. J. Abscisic acid (ABA) and low temperatures synergistically increase the expression of CBF/DREB1 transcription factors and cold-hardiness in grapevine dormant buds. **Annals of Botany**, Leicester, v. 123, p. 681-689, 2019.

SANTAROSA, E. *et al.* Alterações anatômicas do sistema vascular em porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 4, p. 320-329, 2016.

SUN, X. Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR 057. **Scientific Reports**, London, v. 6, 24066, 2016.

TANDONNET, J. -P *et al.* Scion genotype biomass allocation and root development in grafted grapevine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, n. 16, p. 290-300, 2010.

VERGARA, R. *et al.* ABA represses the expression of cell cycle genes and may modulate the development of endodormancy in grapevine buds. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v. 8, n. 812, p. 1-10, 2017.

VILLA, F.; DALL'OGGIO, P. A.; POTRICH, C. Formação de mudas de videiras labruscas através de enxertia de mesa em região subtropical de baixa altitude. **Scientia agraria paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 17, n. 2, 2018.

VRŠIČ, A. S.; PULKO, A. B.; KOCSIS, B. L. Factors influencing grafting success and compatibility of grape rootstocks. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 181, n. 2, p. 168-173, 2015.

ZAPATA, D. *et al.* Estimation of the base temperature and growth phase duration in terms of thermal time for four grapevine cultivars. **International Journal Biometeorol**, Hoogenboom, v. 59, p. 1771-1781, 2015.

ZHENG, C. *et al.* Abscisic Acid Catabolism Enhances Dormancy Release of Grapevine Buds. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 2490-2503, 2018.

ZUFFEREY, V. Carbohydrate reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Chasselas'): the influence of the leaf to fruit ratio. **Vitis**, Siebeldingen, v. 51, n. 3, p. 103-110, 2012.

WAITE, H.; WHITELAW-WECKERT, M.; TORLEY, P. Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine planting material. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 43, n. 2, p. 144-161, 2015.

WESTWOOD, M. N.; BJORNSTAD, H. D. Winter rainfall reduces rest period of apple and pear. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 103, n. 1, p. 142-144, 1978.

4 CAPÍTULO 2

Caracterização das qualidades fitotécnica e fitohormonal em mudas de videira sob diferentes condições de manejo

4.1 Introdução

Estudos relacionados à qualidade de mudas, com ênfase na ontogenia de enxertia, podem ser conduzidos em diversas linhas. Tradicionalmente, de uma forma mais expedita, a qualidade das mudas pode ser analisada a partir de indicadores fitotécnicos. Estes permitem uma visão descritiva, rápida e muitas vezes não destrutiva do padrão de compatibilidade enxerto/porta-enxerto ou da qualidade final da muda. Goussard (1977) estabeleceu as bases dos indicadores fitotécnicos para caracterização da calogênese em mudas de videira, a partir de uma escala visual que detalha de forma qualitativa e quantitativa sua formação. Posteriormente, indicadores compostos foram sendo construídos como por Kösea *et al.* (2015) empregando escores relativos, justificando que na formação da muda alguns indicadores são mais relevantes do que outros no estabelecimento da qualidade final.

Apesar da praticidade dos indicadores fitotécnicos, os resultados são pouco aprofundados/discutidos ou generalistas. Ou seja, não há um detalhamento na seleção dos fatores que causam benefícios ou restrições sobre a qualidade de cada processo de formação da muda. Este avanço, só é possível a partir de uma amarração destes índices com outros indicadores complementares, como bioquímicos e biotecnológicos. Neste caso, alguns trabalhos têm focado na anatomia e na morfologia da enxertia, buscando, por exemplo, a caracterização das interações vasculares que ocorrem na fusão entre enxerto e porta-enxerto (Santarosa *et al.*, 2016). Mais recente, com a evolução de protocolos e de equipamentos em estudos bioquímicos surgem novas possibilidades ou ferramentas para se caracterizar melhor a interação enxerto/porta-enxerto,

prospectando-se, com isso, novos indicadores de qualidade para mudas. A vantagem dos métodos bioquímicos, frente aos tradicionais anatômicos e fitotécnicos, é a sua capacidade de indicar possíveis incompatibilidades ainda nas fases iniciais da produção da muda (Assunção *et al.*, 2016; Assunção *et al.*, 2019).

Dentre as ferramentas mais difundidas na atualidade para quantificação de indicadores bioquímicos em mudas enxertadas, destacam-se a eletroforese, a cromatografia e a tomografia (Porika *et al.*, 2016). Em videiras, trabalhos utilizando cromatografia associada à espectrometria para a detecção do perfil fitohormonal já tem sido aplicado, mas limitados à detecção de poucos compostos ou grupos hormonais. Para contornar esta limitação, o UPLC - "*Ultra Performance Liquid Chromatography*", uma evolução tecnológica do HPLC ("*High Performance Liquid Chromatography*"), apresenta-se como uma opção de menor custo para quantificação de amostras complexas. Além disso, quando o ULPC está acoplado a um detector de espectrometria de massa (LC-MS/MS, "*liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*"), o conjunto é altamente seletivo e sensível para detecção e quantificação de metabolitos de baixa concentração em amostras pequenas (gramas) e complexas (Cui *et al.*, 2015), como fitohormônios. O protocolo básico para utilização do LC-MS/MS em fruteiras de clima temperado foi ajustado por Garighan (2017). Neste caso, foi utilizado para detecção de ABA, GA₃, GA₄, AIA, AJ, AS e Zeatina em gemas dormentes e tecidos pigmentados de macieira, mostrando-se sensível e preciso na quantificação.

Neste capítulo foi avaliado o perfil fitohormonal de mudas, em diferentes genótipos de videira, na pós-forçagem, por LC-MS/MS, associando a variabilidade quantitativa de cada classe fitohormonal com as respostas fenotípicas em calogênese, brotação e enraizamento. Para tanto, foi aplicada uma análise exploratória referente à dinâmica da concentração de nove fitohormônios: AIA (ácido indol acético), EPI (24-epi-brassinolídeo), Z (zeatina), *t*-ZR (*trans*-Zeatina Ribosídica), GA₃ (ácido giberélico 3), GA₄ (ácido giberélico 4), AJ (ácido jasmônico), ABA (ácido abscísico) e AS (ácido salicílico). Estes foram quantificados em três porções da muda: enxerto, enxertia e porta-enxerto.

4.2 Material e Métodos

No desenvolvimento deste capítulo foram utilizadas partes dos experimentos 1, 2 e 4, conduzidos no CAPÍTULO I, considerando os dados do ano de 2018, totalizando 11 tratamentos (fatores). Do experimento 1, foram contrastados três

tratamentos, provenientes da combinação genética enxerto x porta-enxerto: 'Bordô'/'Paulsen 1103', 'Riesling Itálico'/'Paulsen 1103' e 'BRS Violeta'/'Paulsen 1103, apenas na coleta "final de julho" (23/07/2018) e enxertia após 30 dias em frio. Do experimento 2, na combinação 'Bordô'/'Paulsen 1103', quatro tratamentos foram contrastados: 1- coleta em julho (23/07/2018) e enxertia após 60 dias em frio; 2-coleta em julho e enxertia sem frio; 3-coleta em agosto (23/08/2018) e enxertia após 60 dias em frio; 4-coleta em agosto e enxertia sem frio. Do experimento 4, na combinação 'Bordô'/'Paulsen 1103', quatro tratamentos foram contrastados: 1- coleta em maio (20/05/2018) e enxertia após 90 dias em frio, com aplicação de etefon; 2- coleta em maio e enxertia após 90 dias em frio, sem aplicação de etefon; 3- coleta em julho e enxertia após 30 dias em frio, com aplicação de etefon; 4- coleta em julho e enxertia após 30 dias em frio, sem aplicação de etefon.

A unidade experimental foi representada pela combinação E/PE (muda). Cada repetição (amostra) foi constituída de cinco mudas (subamostras), de modo que, em cada tratamento, obtiveram-se quatro repetições (totalizando 20 plantas por tratamento). Os tratamentos, em cada experimento, foram dispostos no delineamento completamente casualizado.

Na produção de mudas utilizou-se o sistema de enxertia de mesa do tipo ômega, baseado no protocolo definido por Regina (2002), Kuhn *et al.* (2007) e Waite *et al.* (2015), conforme já detalhado no CAPÍTULO I e resumido a seguir. Estacas lenhosas foram coletadas no jardim clonal e mantidas em câmara frigorífica ($3\pm 1^{\circ}\text{C}$) até o momento da enxertia. Posteriormente, as enxertias foram realizadas com máquina semi-automatizada. Após, as mudas foram submetidas ao processo de parafinagem, com a utilização da cera comercial ACTYGREEF® (origem Espanha - empresa Quimiwax, contendo 0,01% de oxyquinolinona e 0,00175% de 2,5DBA), previamente dissolvida em banho-maria na temperatura de 65-70°C. As mudas então foram colocadas em caixas contendo vermiculita umedecida no fundo (3 cm de camada) e fechadas com filme plástico para manutenção da umidade acima de 80%. As caixas foram submetidas à forçagem em câmara de crescimento sem iluminação, regulada com temperatura entre 27 e 28°C, durante o período de 30 dias. Após sete dias da saída da forçagem, as mudas são consideradas aclimatadas e aptas ao plantio no viveiro.

Nas mudas aclimatadas, foram realizadas as avaliações dos indicadores fitotécnicos de qualidade, conforme já detalhado no CAPÍTULO I. Neste caso, foram consideradas as seguintes variáveis: (1) frequência de plantas com formação de

calo na enxertia, (2) frequência de plantas com presença de brotação e (3) frequência de plantas com crescimento de raízes adventícias; (4) percentual de formação do calo no entorno da região da enxertia (conforme escala proposta por Celik (2000), que têm como limites: alta (75-100%), média (25-50%) e baixa (0-25%); (5) taxa de crescimento do diâmetro frontal do calo em relação ao diâmetro do porta-enxerto; (6) estágio de desenvolvimento dos novos brotos no enxerto (conforme Eichorn e Lorenz, 1977). Além das seis variáveis de qualidade, foi obtido o escore de qualidade da muda (adaptado de Lajeunesse, 2011), utilizado para avaliar o desempenho dos tratamentos em formar mudas.

Imediatamente após as avaliações fitotécnicas, porções de aproximadamente 2,0 cm e contemplando separadamente o enxerto, a região da enxertia e o porta-enxerto foram obtidas de cada muda. Para tanto, a cera de enxertia que recobria todas estas porções, foi raspada em sua totalidade com a utilização de estilete, mantendo-se o cuidado em preservar os tecidos corticais da casca (Fig.1A). Cabe destacar ainda que, do enxerto, descartou-se da porção a gema, utilizando-se o segmento vegetal logo abaixo desta, com os 2,0 cm de comprimento (Fig.1B). Imediatamente após o corte, cada amostra foi congelada em nitrogênio líquido (-192°C), em tubos tipo “falcon” de 50 mL (Fig.1C). Os tubos de amostras foram transportados em nitrogênio líquido e estocados em freezer (-20°C) até o momento do processamento (Fig.1D).

Para a determinação do perfil hormonal, utilizou-se como base o protocolo que foi previamente desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Uva e Vinho e validado para quantificação hormonal em gemas de macieira (Garighan, 2017). Esta metodologia foi ajustada para a quantificação de nove fitohormônios em tecidos lignificados de videiras: Ácido Abscísico (ABA), Ácido Indol-Acético (AIA), Ácido Salicílico (AS), Ácido Jasmônico (AJ), Ácido Giberélico 4 (GA₄), Ácido Giberélico 3 (GA₃), Zeatina (Z), *trans*-Zeatina Ribosídica (*t*-ZR) e Epibrassinolide (EPI), empregando-se para detecção um equipamento UPLC-MS/MS (*Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*).

As amostras congeladas foram inicialmente trituradas, sem perder o congelamento para evitar oxidação. Para isso, utilizou-se um moinho criogênico SPEX Sample Prep® (modelo 6870), o qual concilia os efeitos do impacto e do congelamento em nitrogênio líquido para obter uma trituração final com granulometria extremamente fina.

Para a extração hormonal, foram pesadas 800 mg de tecido (massa fresca) e 100 mg de uma mistura de sais (MgSO_4 ; NaCl ; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$; em proporção de 4:1:1:0,5) em tubos Falcon de 15mL. A extração foi realizada ao longo de quatro dias com solução composta por acetonitrila, metanol e ácido fórmico, nas proporções 50:45:5 v/v. No primeiro dia, foram adicionados 4 mL de solução de extração às amostras, fechados os tubos e estes, mantidos por 24h sob agitação intermitente em agitador tipo gangorra modelo Rocker 25 da Labnet International, dentro de geladeira ($4 \pm 1^\circ\text{C}$). No segundo dia, os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada Jouan BR4i a 6000 rpm e temperatura de 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), sendo os sobrenadantes coletados em outro tubo. Foram adicionados mais 3 mL de solução de extração às amostras e estas, mantidas novamente em agitação sob mesmas condições e período de tempo. No terceiro dia, os tubos foram novamente centrifugados, os sobrenadantes coletados e adicionados mais 3 mL de solução de extração às amostras, que, nas mesmas condições, permaneceram mais 24h em agitação para última etapa da extração. No quarto dia, os tubos foram centrifugados pela última vez, os sobrenadantes coletados e reunidos em um único tubo, totalizando aproximadamente 10 mL de extrato. A fim de limpar melhor as amostras e precipitar quaisquer partículas que estivessem em suspensão, os tubos com o extrato total foram centrifugados por 15min em mesma centrífuga e condições supracitadas, sendo o extrato final transferido a outro tubo. Os extratos foram concentrados em SpeedVac, modelo plus 5301, da Eppendorf®, a 30°C , até o volume final de 100 μL , sendo, após, adicionados 3 mL de solução de ácido fórmico (1M) aos concentrados. Esta ressuspensão foi aplicada, um mL por vez, em colunas SPE Oasis MCX da Waters para purificação, previamente umedificadas com 3 mL de metanol e 6mL de água purificada Milli-Q. Uma vez nas colunas, as amostras foram eluídas em três etapas: na primeira, adicionando-se 2 mL de solução de ácido fórmico (1M, em água), descartando-se o eluído; na segunda, com 3 mL de metanol seguida por 1mL de água purificada Milli-Q; e, na terceira, com três concentrações crescentes de hidróxido de amônio, 0,004M, 0,04M e 0,4M, sendo adicionados 1,5 mL de cada concentração. Os eluídos da segunda e terceira etapa foram coletados em tubos de Falcon de 15 mL e concentrados até volume final mínimo de aproximadamente 50 μL . A este concentrado, foram adicionados 100 μL de metanol 60% e o tubo agitado com auxílio de vórtex até completa solubilização do concentrado, e após, adicionados 100 μL de água pura Milli-Q, ajustando a

concentração final da ressuspensão para 70% água: 30% metanol. As amostras foram então filtradas em filtros PTFE de 0,22 μm e dispensadas em vials com inserts de 300 μL .

Para a quantificação foi utilizado um sistema UPLC de bomba quaternária (Acquity UPLC™ System, Waters, USA), equipado com amostrador automático e refrigerado (4°C), onde permaneceram os vials das amostras durante a análise. Na separação cromatográfica foi empregado uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (Waters, EUA) (2,1 x 50 mm, 1,7 μm), em conjunto com pré-coluna Acquity UPLC BEH C18 (Waters, EUA) (2,1 x 5 mm, 1,7 μm). A fase móvel foi constituída de uma mistura binária do eluente A (água com 0,1% de ácido fórmico) e do eluente B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico). O gradiente foi de 1% a 20% de B em 2min, de 20% a 38% em 4,2min e então de 38% até 100% em 6,5min, sendo mantido assim até 8,5min e retorno para condição inicial de 1% de B em 8,6min até 9,5min, com um fluxo de 0,3 mL min⁻¹ e com uma temperatura de coluna em 40°C. Foi aplicado um volume de injeção de 5 μL de amostra em todas as análises. Para detecção foi utilizado um sistema de espectrometria de massa do tipo quadrupolo triplo (Waters, modelo Xevo™ TQ), equipado com a interface ESI e ajustado com as seguintes condições: tensão capilar, 2,5 kV; Temperatura da fonte, 150°C; temperatura de dessolvatação de 650°C; Fluxo do gás de dessolvatação (nitrogênio), 800 L h⁻¹; Fluxo de gás no cone (nitrogênio), 100 L h⁻¹; e fluxo do gás de colisão (argônio), 0,5 ml min⁻¹.

Na detecção foi empregado o modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), cujos parâmetros de detecção de MS/MS foram previamente otimizados para cada hormônio, considerando, respectivamente, os dados de transições (m/z), voltagem do cone (V), voltagem de colisão para fragmentação (V), modo de ionização (positivo ou negativo) e tempos de retenção (min) para para cada hormônio, sendo: ABA (263>153, 40, 20, negativo, 4,22min), AS (137>93, 34, 18, negativo, 3,62min); AJ (209>59, 24, 17, negativo, 5,18min), Z (220>136, 30, 17, positivo, 2,29min), *t*-ZR (352>136, 25, 27, positivo, 2,62min), GA₃ (331>213, 60, 32, negativo, 3,03min), GA₄ (345>142, 35, 23, negativo, 6,25min), AIA (174>130, 18, 12, positivo, 4,49min) e AIA-d2 (178>132, 18, 12, positivo, 4,49min). Para a curva padrão, foram pesadas com precisão as amostras dos padrões ABA (A1049), AS (S5922), GA₃ (G7645), GA₄ (G7276), AJ (J2500), AIA (I2886), AIA-d2 (492817), Z (Z0164), *t*-ZR (Z3541) (Sigma-Aldrich), as quais foram dissolvidos em metanol para preparação de 1 mg ml⁻¹ de solução estoque. Todas as soluções foram

armazenadas no escuro e foram diluídas em série de metanol imediatamente antes da utilização. A curva padrão, com a sequência de concentração de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng ml⁻¹, foi preparada em três diluições independentes na matriz da amostra (38% de amostra em metanol) com análise/quantificação em LC-MS/MS em triplicata. Para a quantificação, foram respeitados os limites de detecção (LOD, superior a 3) e de quantificação (LOQ, superior a 10) para a razão sinal/ruído de cada hormônio, utilizando o software TargetLynx™ (Waters, EUA). Para determinar a eficiência de recuperação e o efeito da matriz, 100 ng mL⁻¹ de padrões foram incrementados em uma amostra (repetição) de cada experimento e tecido no início da extração. A recuperação e o efeito da matriz foram determinados pela comparação das áreas de pico do padrão analítico acrescido antes e após a extração.

Nas análises estatísticas utilizou-se a multivariada, a partir do método dos componentes principais (PCA – *Principal Components Analysis*). Para adequação dos valores das variáveis à PCA, as variáveis fitotécnicas foram previamente autoescaladas para remoção da influência da ordem de grandeza das unidades de medida e, posteriormente, centradas à média. Cada PCA integrou os ‘escores’ dos fatores com os ‘pesos’ das variáveis da qualidade. Para o contraste de grupos independentes na espacialização da PCA, foram ajustadas barras de desvio padrão múltiplo ($\pm 2\sigma$). Ao se contrastar os grupos, aqueles que não se sobrepueram vertical ou horizontalmente, foram considerados distintos. Também foi obtido o indicador ‘peso acumulado na PCA’ para análise do efeito conjunto dos nove fitohormônios sobre a qualidade das mudas. Para cálculo deste indicador, foram somados os ‘pesos’ de cada fitohormônio nas duas componentes principais (PC1 e PC2) determinadas pela geração da PCA. Neste caso, para certo tratamento, quanto maior o valor do ‘peso acumulado’ de um fitohormônio, maior o seu efeito (impacto) na definição da qualidade da muda. Adicionalmente, análise paramétrica foi aplicada, a partir de matriz de correlograma (identificando-se sua força por meio de Pearson a 5%). Este foi aplicado entre as variáveis da qualidade de mudas e os fitohormônios, sobre as 11 observações resultantes dos tratamentos. Também, análise não-paramétrica foi aplicada, por meio do Qui-quadrado ($p < 0,05$), seguido do teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes para comparação de médias. Os testes estatísticos foram realizados a partir do *software* R, pacote *Agricolae* (R Core Team, 2020). Para a análise multivariada foi utilizado o *software* ChemoStat (Helfer *et al.*, 2015).

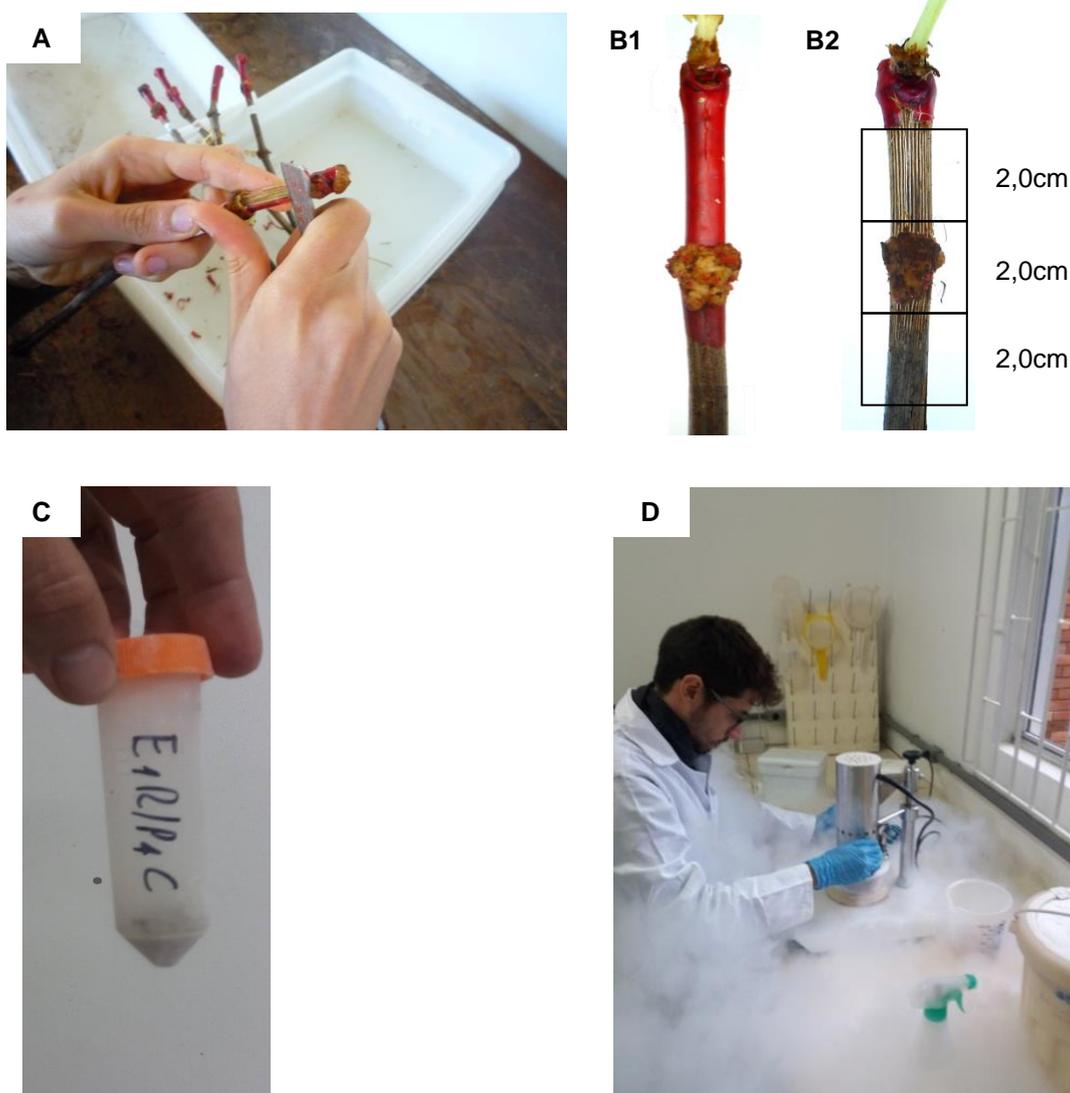


FIGURA 1. Aspectos gerais da metodologia empregada para coleta e obtenção das amostras de tecido vegetal, utilizadas na quantificação do perfil fitohormonal. Raspagem da cera (A). Detalhe do enxerto antes (B1) e depois da raspagem (B2). Corte de segmentos e acondicionamento no pré-processamento (C). Processamento prévio de amostras, empregando nitrogênio líquido, para a moagem antes da extração dos fitohormônios (D). Bento Gonçalves, set/2019.

4.3 Resultados

Na sequência, estão detalhados os resultados que foram obtidos nos três grupos experimentais, analisados de forma conjunta.

4.3.1 Variação dos fitohormônios em função das condições de manejo com as mudas

A capacidade dos nove fitohormônios em contrastar condições de manejo foi analisada de forma conjunta através do ajuste da PCA. Observa-se na Figura 2 que, nos três experimentos (Fig.2A1.B1.C1), foi possível a discriminação entre tratamentos. Enquanto que alguns se mantiveram na mesma componente indicando similaridade, outros apresentaram elevada discriminação, mantendo-se isolados dentro de específico quadrante.

No experimento de cultivares (Fig.2A1), 'Violeta' discriminou-se de 'Riesling' e 'Bordô', ficando na posição negativa à PC1 com 99,4% da variância. Ao analisarem-se os fitohormônios associados a este comportamento, destaca-se na Tab.1A1 que 'Violeta' apresentou maior frequência do 'peso acumulado' (77,8%), seguido por 'Bordô' (55,0%) e 'Riesling' (33,0%). Além disso, 'Violeta' apresentou 'peso acumulado' médio positivo (0,096), diferente das demais. Especificamente, o ácido salicílico (AS) foi o fitohormônio com a maior contribuição para discriminação de 'Violeta', pois apresentou maior valor somente nesta cultivar. O ácido abscísico (ABA) foi o fitohormônio com a segunda maior contribuição, mas sendo positivo também em 'Bordô'. Outros fitohormônios com contribuição positiva em 'Violeta' (em ordem decrescente do 'peso acumulado') foram: *trans*-Zeatina Ribosídica (*t*-ZR), Ácido Jasmônico (AJ), Ácido Giberélico 4 (GA₄) e Zeatina (Z). Por outro lado, Ácido Indol-Acético (AIA), Epibrassinolide (EPI) e Ácido Giberélico 3 (GA₃) apresentaram valores negativos do 'peso acumulado' nesta cultivar, mas destacados com valores positivos em 'Riesling'.

No experimento de épocas de coleta (Fig.2B1), a coleta no mês agosto sem passagem por armazenamento, discriminou-se das demais com 5,45% da variância, estando positivo à PC2. Outro tratamento destacado foi a coleta em agosto com 60 dias de armazenamento, que se manteve isolado nos quadrantes negativos da PC1 e PC2. Neste tratamento também ocorreu a maior frequência de 'pesos acumulados' (88,9%), seguido pela coleta em julho (com ou sem armazenamento) (55,6%) e, por último, a coleta em agosto sem armazenamento (33,3%) (Tab.1A2). Destaca-se, ainda, na coleta em agosto com armazenamento,

o maior valor médio do 'peso acumulado' (0,048). Também, apenas neste tratamento, AS e ABA apresentaram os maiores 'pesos acumulados'. Outros fitohormônios com valores positivos deste indicador neste tratamento foram: TZ, AJ, GA₃ e Z. Já AIA, EPI e GA₄ apresentaram 'pesos acumulados' variando de nulos a negativos, mas sendo positivos na coleta em agosto, sem passagem pelo armazenamento.

No experimento de uso do etefon (Fig.2C1), as coletas em maio se discriminaram de julho com 92,43% da variância, estando positivas à PC1. Nesta coleta ainda se discriminou o uso de etefon, isolado no quadrante positivo à PC1 e PC2. Neste tratamento, também ocorreu a maior frequência de 'pesos acumulados' positivos (77,8%) seguida pela condição com etefon (66,7%) e então a coleta de julho, com e sem etefon (44,4% e 22,2%, respectivamente) (Tab.1A3). Na coleta de maio sem etefon ainda ocorreu o maior 'peso acumulado' médio (0,102). Já nas diferenças entre fitohormônios os maiores 'pesos acumulados' médios ocorreram em AS e ABA nas coletas em maio e sem etefon. Ainda neste tratamento, 'pesos acumulados' positivos ocorreram para AJ, Z e GA₄.

A concentração dos fitohormônios em cada tratamento foi analisada na Tab.1B. Nos três experimentos, para todos os tratamentos, houve um padrão na diferença de concentração entre fitohormônios, podendo-se destacar a formação de três grupos. Um grupo com valores acima de 50 ng g⁻¹ (ABA e AS), o segundo, com valores entre 5 e 50 ng g⁻¹ (AIA, GA₃ e TZ) e, o terceiro, com valores abaixo de 5 ng g⁻¹ (Z, GA₄ e EPI). Cabe destacar ainda que, os três tratamentos discriminados através da análise de PCA, foram aqueles com os maiores valores médios de concentração dos nove fitohormônios, de modo que: para 'Violeta' foi 194,9 ng g⁻¹ (Tab.1B1) na coleta em agosto com 60 dias de armazenamento foi 87,9 ng g⁻¹ (Tab.1B2) e na coleta em maio sem a aplicação de etefon foi 68,7 ng g⁻¹ (Tab.1B3).

4.3.2 Capacidade de discriminação da qualidade de mudas pelo perfil de fitohormônios

A variação da qualidade das mudas entre tratamentos foi analisada a partir da análise exploratória em cada experimento (Fig.2A2.B2.C1). Estas PCA's foram então relacionadas àquelas determinadas pelo perfil fitohomornal de cada tratamento (Tab.1).

No ensaio de cultivares (Fig.2A2) destacou-se 'Violeta', discriminada dos demais tratamentos, estando negativa à PC1 com 84,83% da variância. Esta cultivar apresentou apenas menor enraizamento, sendo as outras cinco variáveis superiores às demais cultivares. Assim, 'Violeta' destacou-se tanto na maior qualidade de mudas, como também, na maior concentração de fitohormônios (Tab.1B1). Contrastando com a 'Violeta', 'Riesling' apresentou a menor qualidade de mudas, de modo que, apresentou apenas o enraizamento superior (Fig.2A2). Novamente, 'Riesling' apresentou tanto menor concentração de fitohormônios (Tab.1B1), quanto menor qualidade de mudas.

No ensaio de épocas de coleta (Fig.2B2), a maior variação dos dados foi decorrente da utilização do armazenamento, tanto em julho quanto em agosto, com 64,57% da variância, estando negativos à PC1. Com exceção do percentual de plantas com calos, todas as demais variáveis fitotécnicas apresentaram maiores valores nestes tratamentos. Já, a coleta em agosto sem a utilização do armazenamento também se discriminou, estando positiva na PC2 com 26,73% da variância. Neste caso, houve a menor associação às variáveis da qualidade, destacando-se apenas o percentual de brotação e de enraizamento. Assim, a coleta em agosto sem armazenamento, refletiu-se tanto em menor qualidade da muda, quando na menor concentração de fitohormônios (Tab.1B2). Contrariamente, a coleta de agosto com 60 dias de armazenagem, destacou-se com alta qualidade de mudas e maiores concentrações de fitohormônios (Tab.1B2). Cabe salientar que, apesar da qualidade fitotécnica de julho com 60 dias de armazenamento ser similar à de agosto, a concentração de fitohormônios em agosto foi superior (Tab.1B2).

Na utilização do etefon (Fig.2C2), a maior variação dos dados foi decorrente da época de coleta em maio. Ou seja, independente da presença ou ausência de etefon, a coleta em maio em si já respondeu por 87,96% da variância, sendo positivo à PC1. Também, as seis variáveis fitotécnicas estiveram positivamente associadas a estes tratamentos. Além disso, a coleta em maio sem etefon se discriminou positivamente à PC2, com 10,65% da variância, acompanhado por quatro variáveis fitotécnicas. Assim, este tratamento apresentou tanto a maior qualidade fitotécnica de mudas, quanto maior acúmulo fitohormonal (Tab.1C2).

Apesar de a análise exploratória comprovar as relações gerais da variação fitohormonal e da qualidade fitotécnica da muda na discriminação de condições de manejos, uma matriz de correlograma foi aplicada. Na Tab.2, destaca-se a

associação entre as variáveis fitotécnicas, principalmente entre a brotação e a calogênese. Por outro lado, o diâmetro do calo não se correlacionou à taxa de formação de calos e estágio dos brotos. Já no enraizamento, a variabilidade dos valores não permitiu a obtenção de uma associação satisfatória com nenhuma variável fitotécnica. Quanto à associação das variáveis de qualidade ao escore da qualidade de mudas, com exceção do enraizamento, as demais apresentaram elevados e significativos coeficientes.

Na associação entre variáveis fitotécnicas e fitohormônios, houve elevada e significativa associação da frequência de 'pesos acumulados' com as variáveis fitotécnicas, à exceção do enraizamento (Tab.2). O destaque foi maior na associação entre esta frequência com o diâmetro do calo, permitindo um ajuste satisfatório da função linear ($R^2=0,71$) (Fig.3A). Portanto, com este pressuposto de que a alta concentração de fitohormônios está associada às mudas de maior qualidade (especialmente no diâmetro dos calos), permitiu a identificação dos fitohormônios que mais impactaram na força desta associação. Na correlação da concentração de cada fitohormônio com as variáveis fitotécnicas (Tab.2), destacaram-se: a associação positiva de AS com o diâmetro de calo, ABA com o percentual de plantas com calo e EPI com enraizamento. Por outro lado, AJ apresentou associação antagonística com o tamanho do calo.

Quanto aos demais fitohormônios, apesar de não se associarem de forma significativa com as variáveis de qualidade, o correlograma permitiu identificar algumas tendências de forças na matriz (Tab.2). Correlações com maior força ocorreram entre os fitohormônios e as variáveis de calogênese, em especial o diâmetro do calo. Por outro lado, as correlações com as variáveis de brotação, em especial o percentual de plantas brotadas, apresentaram tendência de menor força. Especificamente, a associação dos fitohormônios com as variáveis fitotécnicas apresentou menor força para: AJ, AIA, Z e GA₄. Já associações que apresentaram maior força foram: EPI, *t*-ZR, GA₃, ABA e AS.

A associação individual dos fitohormônios com as variáveis fitotécnicas foi desdobrada nas três porções da muda (enxerto, enxertia e porta-enxerto) (Tab.3). Inicialmente, destacou-se o AS, apresentando elevada associação ao diâmetro de calos nas três porções. A força desta associação foi suficiente para que ocorresse relação linear significativa de AJ, especialmente na porção do enxerto (Fig.3B). O ABA foi outro que apareceu nas porções do enxerto (associado a quatro variáveis fitotécnicas) e na enxertia (associado apenas ao diâmetro do calo). ABA também

apresentou relação com a variação da qualidade de mudas, mas neste caso, sobre o percentual de plantas com calos (Fig.3C). Destaca-se que, apesar de AS e ABA apresentarem tendência de influenciar positivamente o aumento da calogênese, este efeito foi moderado (R^2 em torno de 0,50 em ambos). Também, GA₄ se destacou com alta associação com o diâmetro do calo, tanto no enxerto como no porta-enxerto. Neste caso, sua relação foi considerada satisfatória ($R^2=0,71$) para predição a partir da sua concentração no enxerto (Fig.3D). Já GA₃, apresentou menos evidência na associação com as variáveis fitotécnicas. Houve moderada associação positiva, na porção do porta-enxerto, com o diâmetro de calos (Tab.3). Mas neste caso, a variabilidade dos dados ($R^2=0,32$) não permitiu inferir uma relação de causa e efeito deste fitohormônio (Fig.3E).

Outros fitohormônios apresentaram associação negativa com variáveis da qualidade (Tab.3). Destacou-se o AIA, na região da enxertia, estando negativamente associado às duas variáveis de brotação. Apesar disto, não se evidenciou relação de causa e efeito do aumento da concentração de AIA com a queda da brotação, sendo considerada fraca ($R^2=0,32$) (Fig.3F). Apesar desta suposta relação antagonista, no AIA do porta-enxerto, houve moderada associação positiva com o diâmetro de calos (Tab.3). Da mesma forma, EPI no enxerto se correlacionou negativamente com as variáveis de brotação (Tab.3). Por outro lado, ressalta-se a associação positiva dos valores de EPI no enxerto e porta-enxerto com o enraizamento. Estas associações apresentaram força suficiente para indicar tendência moderada positiva ($R^2=0,42$) no aumento do enraizamento (Fig.3G).

Finalmente, Z e t-ZR destacaram-se por não se associarem às variáveis de qualidade, em nenhuma porção da muda (Tab.3). Quanto ao AJ seu destaque foi no indicativo de associação negativa com as variáveis fitotécnicas. Neste caso, destacaram-se as concentrações na enxertia e porta-enxerto associando-se de forma inversa ao diâmetro de calos (Tab.3). Apesar desta tendência, a variabilidade dos dados ($R^2=0,30$) não permitiu uma relação de causa e efeito de AJ sobre a queda desta variável (Fig.3H).

4.3.3 Variação dos fitohormônios entre diferentes porções da muda

A partir do correlograma da Tab.3, foi evidenciada a variação das forças das associações entre as diferentes porções da muda. A maior ocorreu na porção do porta-enxerto, onde 46% das correlações foram positivas. Já na porção da enxertia, a frequência de associações positivas reduziu para 43% e, no enxerto, para 32%.

Assim, evidenciou-se a tendência da expressão diferenciada dos fitohormônios ao longo das porções, sendo predominante no sentido enxerto ao porta-enxerto. A partir desta condição, foi detalhado este padrão geral nas Figuras 4 e 5, considerando os tratamentos mais contrastantes, indicados pela Figura 2, nos três experimentos.

De forma geral, alguns fitohormônios não apresentaram variações em suas concentrações em nenhum dos experimentos ao longo das porções. EPI (Fig.4) e GA₄ (Fig.5) apresentaram valores médios entre os três experimentos de 1,37 e 0,99 (ng g⁻¹), respectivamente.

AS e ABA apresentaram tendência de variação entre porções, reduzindo as suas concentrações no sentido enxerto ao porta-enxerto (Fig.5). Porém, este padrão foi mais evidente em AS, pois ocorreu nos três experimentos e especialmente no exp.1, com grandes diferenças entre porções na 'Violeta'. Para ABA, nos experimentos 1 e 3, não se observaram diferenças consistentes entre porções. Contrastes significativos entre porções puderam ser destacados somente na condição de exposição do material vegetal ao frio artificial (exp.2).

Quanto ao GA₃, Z e *t*-ZR (Fig.4) e AIA (Fig.5), ocorreu o mesmo padrão entre porções, aumentando a concentração dos fitohormônios no sentido do enxerto ao porta-enxerto. As diferenças entre porções ocorreram de forma mais consistente no ensaio de cultivares (exp.1), tendo 'Violeta' a maior variação. GA₃ também apresentou diferenças entre porções nos experimentos 2 e 3. Mas neste caso, os baixos valores obtidos não permitiram definir um padrão entre porções. *t*-ZR apresentou tendência de aumento consistente da concentração na direção do porta-enxerto nos seguintes tratamentos: em 'Violeta' (exp.1), sob exposição ao frio artificial (exp.2) e sem a utilização de etefon (exp.3).

Finalmente, para AJ seu comportamento foi variável entre experimentos (Fig.5). A diferença entre porções ocorreu no tratamento sem utilização de etefon (exp.3) e sob exposição ao frio artificial (exp.2), mas sem um padrão definido entre porções. Por outro lado, no experimento com cultivares (exp.1) não foram verificadas diferenças entre porções para as duas cultivares.

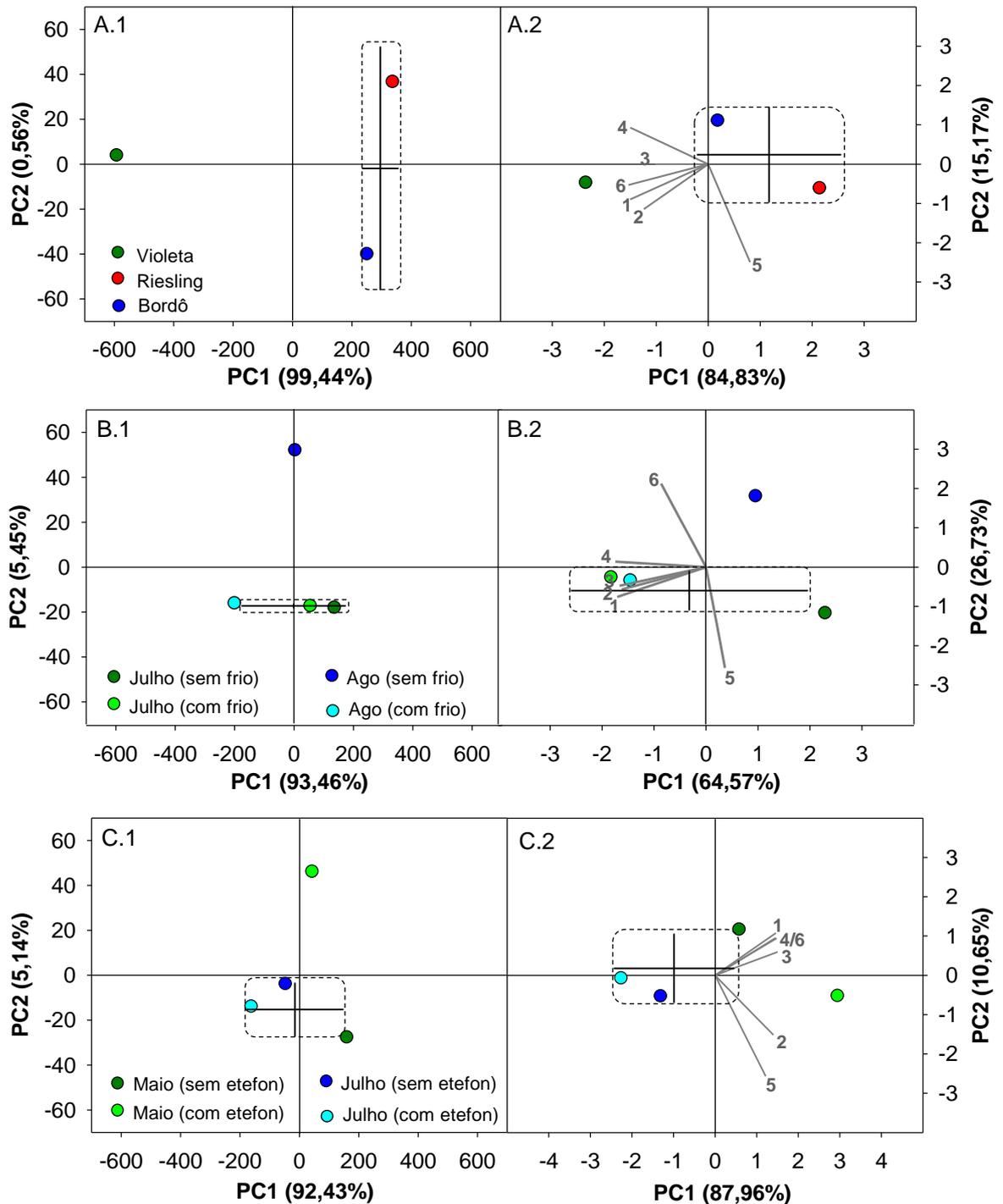


FIGURA 2. Gráficos de escores resultante da PCA formada pelos fatores: cultivar (A); época de coleta (B) e utilização ou não do etefon (C). Os fatores foram associados as variáveis fitohormonais (A1, B1, C1) e fitotécnicas (A2, B2, C2). Em A2, B2 e C2 gráficos de pesos obtidos a partir das variáveis: estágio do broto (1), diâmetro do calo (2), taxa de formação do calo (3) e percentual de plantas com: brotação (4), calos (5) e raízes (6). *Tratamentos não sobrepostos pela barra múltipla de desvio padrão ($\pm 2\sigma$) indicam sua discriminação amostral.*

TABELA 1. Peso acumulado na PCA e concentração (ng g⁻¹) (na média das três porções) dos fitohormônios (AIA, EPI, Z, t-ZR, GA₃, GA₄, AJ, ABA, AS (HORM.) nos seguintes experimentos: cultivares ('Riesling', 'Bordô' e 'Violeta' sobre 'Paulsen1103') (1); épocas de coleta (jul e ago) com e sem armazenagem em câmara frigorífica (60 dias); (2) épocas de coleta (mai e jul) com e sem uso de etefon (aplicado em abril) (3).

HORM.	A. Peso acumulado			B. Concentração				
	Riesling	Bordô	Violeta	1. Cultivares				
	Riesling	Bordô	Violeta	Riesling	Bordô	Violeta		
AIA	0,065	-0,090	-0,065	21,7 ^{ab}	3,8 ^b	33,5 ^{ab}		
EPI	0,008	-0,008	-0,008	1,7 ^b	0,0 ^b	0,6 ^b		
Z	-0,003	0,003	0,003	0,9 ^b	1,6 ^b	1,1 ^b		
t-ZR	-0,084	0,072	0,084	28,1 ^{ab}	43,1 ^{ab}	47,0 ^{ab}		
GA ₃	0,037	-0,050	-0,037	17,7 ^b	7,6 ^b	24,1 ^{ab}		
GA ₄	-0,008	0,007	0,008	0,9 ^b	2,5 ^b	1,9 ^b		
AJ	-0,017	0,015	0,017	2,2 ^b	5,3 ^b	6,3 ^b		
ABA	-0,387	0,316	0,387	129,7 ^a	196,3 ^a	228,6 ^{ab}		
AS	-0,475	-0,569	0,475	573,7 ^a	482,6 ^a	1411,2 ^a		
Media	-0,096	-0,034	0,096	86,3	82,5	194,9		
Freq.	33,3	55,6	77,8	0,003**	0,003**	0,003**		
HORM.	2. Época de coleta							
	Julho		Agosto		Julho		Agosto	
	0	60	0	60	0	60	0	60
AIA	-0,023	-0,023	0,031	-0,031	2,4 ^b	3,2 ^b	12,3 ^b	2,5 ^b
EPI	-0,001	-0,001	0,000	0,000	0,0 ^b	0,6 ^b	0,3 ^b	0,6 ^b
Z	0,003	0,003	-0,005	0,005	1,5 ^b	1,0 ^b	0,2 ^b	1,6 ^b
t-ZR	0,063	0,063	-0,059	0,059	13,2 ^b	38,1 ^{ab}	5,3 ^b	14,5 ^b
GA ₃	0,010	0,010	-0,029	0,029	7,9 ^b	11,5 ^b	4,4 ^b	13,9 ^b
GA ₄	0,000	0,000	0,001	-0,001	0,9 ^b	0,8 ^b	0,9 ^b	0,4 ^b
AJ	0,080	0,080	-0,045	0,045	31,2 ^{ab}	1,5 ^b	1,9 ^b	6,0 ^b
ABA	-0,136	-0,136	-0,312	0,312	79,8 ^a	114,0 ^a	81,0 ^a	232,6 ^{ab}
AS	-0,733	-0,733	-0,018	0,018	220,6 ^a	293,1 ^a	368,0 ^a	519,3 ^a
Media	-0,082	-0,082	-0,048	0,048	39,7	51,5	52,7	87,9
Freq.	55,6	55,6	33,3	88,9	0,002**	0,002**	0,004**	0,002**
HORM.	3. Uso de etefon							
	Maio		Julho		Maio		Julho	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
AIA	0,000	0,002	0,000	-0,002	2,6 ^b	2,2 ^b	2,4 ^b	1,9 ^b
EPI	0,003	0,008	-0,003	-0,008	0,0 ^b	10,7 ^{ab}	0,0 ^b	0,0 ^b
Z	-0,002	0,003	0,002	-0,003	1,0 ^b	0,8 ^b	1,5 ^b	0,8 ^b
t-ZR	0,106	-0,021	-0,106	0,021	42,1 ^{ab}	23,8 ^{ab}	13,2 ^{ab}	13,0 ^{ab}
GA ₃	0,007	0,005	-0,006	-0,004	10,4 ^{ab}	6,2 ^b	7,9 ^b	5,8 ^b
GA ₄	-0,001	0,002	0,001	-0,002	0,6 ^b	0,9 ^b	0,9 ^b	0,4 ^b
AJ	-0,033	-0,330	0,033	0,330	1,9 ^b	13,0 ^b	31,2 ^{ab}	116,9 ^a
ABA	0,172	0,059	-0,172	-0,059	139,7 ^a	44,6 ^{ab}	79,8 ^a	43,1 ^{ab}
AS	0,669	0,214	-0,669	-0,214	419,7 ^a	322,3 ^a	220,6 ^a	136,0 ^a
Media	0,102	-0,007	-0,102	0,007	68,7	47,2	39,7	35,3
Freq.	66,7	77,8	44,4	22,2	0,002**	0,002**	0,007**	0,002**

Freq.: frequência (%) de valores positivos do 'peso acumulado'. Quanto maior a frequência, maior o impacto de cada fitohormônio no aumento da qualidade da muda. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, na coluna, pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). (***) Valor-p significativo à 1% pelo teste- χ^2 .

TABELA 2. Correlograma resultante da associação entre seis variáveis fitotécnicas: estágio de brotos (B_E), diâmetro do calo (C_D), taxa de formação do calo (C_S) e percentual de plantas com: brotação (B_%), calos (C_%), raízes (R_%), e) mais o escore de qualidade das mudas (escore) com nove fitohormônios (concentração média entre as três porções): AIA, EPI, Z, TZ, GA₃, GA₄, AJ, ABA e AS; concentração média dos fitohormônios (MEDIA); 'peso acumulado' médio (PESO) e frequência de valores positivos do 'peso acumulado' (FREQ.) no total de 11 observações obtidas dos exp. 1,2 e 3 (detalhados na Tab. 1).

	B_%	B_E	C_%	C_S	C_D	R_%	escore
B_E	0,96***						
C_%	0,87***	0,87***					
C_S	0,85***	0,91***	0,92***				
C_D	0,60**	0,46	0,68**	0,46			
R_%	-0,25	-0,28	-0,02	-0,04	0,30		
escore	0,87***	0,86***	0,95***	0,92***	0,73**	0,18	
AIA	-0,12	-0,08	0,12	0,02	0,49	0,45	0,17
EPI	0,26	0,16	0,23	0,27	0,41	0,65**	0,45
Z	0,00	0,06	0,17	0,14	-0,23	0,02	0,09
t-ZR	0,34	0,31	0,34	0,16	0,50	0,25	0,39
GA ₃	0,08	0,19	0,45	0,33	0,42	0,41	0,41
GA ₄	0,02	-0,08	-0,04	-0,15	0,39	0,30	0,08
AJ	-0,36	-0,26	-0,48	-0,40	-0,56*	-0,24	-0,50
ABA	0,29	0,27	0,55*	0,34	0,50	0,04	0,42
AS	0,22	0,23	0,48	0,28	0,71**	0,35	0,48
MEDIA	0,22	0,23	0,48	0,27	0,68**	0,32	0,46
PESO	0,46	0,40	0,57*	0,25	0,66**	-0,11	0,44
FREQ.	0,70**	0,65**	0,88***	0,73*	0,65**	0,17	0,84***

Força da associação: -1,0 -0,7 -0,5 0 0,5 0,7 1,0

*,**,***: Valores significativos pelo teste de Pearson ($p < 0,1$; $< 0,05$; $< 0,01$, respectivamente). Variáveis MEDIA, PESO e FREQ. são derivados da Tab.1.

TABELA 3. Correlograma resultante da associação entre seis variáveis fitotécnicas: estágio de brotos (B_E), diâmetro do calo (C_D), taxa de formação do calo (C_S) e percentual de plantas com: brotação (B_%), calos (C_%), raízes (R_%), e) mais o escore de qualidade das mudas (escore) com nove fitohormônios (em três porções da muda: enxerto, corte da enxertia e porta-enxerto): AIA, EPI, Z, t-ZR, GA3, GA4, AJ, ABA e AS no total de 11 observações obtidas dos experimentos 1,2 e 3 (detalhados na Tabela 1).

		B_%	B_E	C_%	C_S	C_D	R_%	escore
Enxerto	AIA	-0,55*	-0,57*	-0,37	-0,34	-0,03	0,43	-0,33
	EPI	-0,65**	-0,61**	-0,39	-0,36	-0,16	0,62**	-0,33
	Z	0,02	0,09	0,02	0,14	-0,63	-0,45	-0,13
	t-ZR	-0,21	-0,30	-0,26	-0,28	-0,06	0,30	-0,19
	GA ₃	0,10	0,16	0,27	0,30	-0,33	-0,23	0,11
	GA ₄	0,51	0,37	0,42	0,29	0,86***	0,39	0,59*
	AJ	-0,27	-0,20	-0,40	-0,36	-0,40	-0,23	-0,44
	ABA	0,54*	0,52	0,72**	0,55*	0,34	-0,29	0,51
	AS	0,23	0,25	0,47	0,28	0,73**	0,35	0,48
Corte da enxertia	AIA	-0,11	-0,05	0,15	0,03	0,48	0,48	0,20
	EPI	0,67**	0,78**	0,81***	0,85***	0,37	-0,12	0,74**
	Z	-0,16	-0,02	0,08	0,08	-0,31	0,06	0,02
	t-ZR	0,37	0,40	0,47	0,30	0,55	0,31	0,51
	GA ₃	-0,24	-0,16	0,01	-0,08	0,24	0,56*	0,07
	GA ₄	-0,25	-0,24	-0,04	-0,20	0,43	0,68**	0,06
	AJ	-0,25	-0,16	-0,22	-0,14	-0,53*	-0,11	-0,25
	ABA	0,22	0,22	0,50	0,27	0,62**	0,33	0,46
	AS	0,11	0,09	0,44	0,23	0,62**	0,49	0,42
Porta-enxerto	AIA	0,09	0,14	0,28	0,16	0,59*	0,28	0,31
	EPI	0,24	0,13	0,19	0,22	0,39	0,60*	0,41
	Z	0,15	0,06	0,20	0,05	0,36	0,28	0,22
	t-ZR	0,32	0,25	0,23	0,08	0,40	0,08	0,27
	GA ₃	0,18	0,26	0,49	0,36	0,57*	0,37	0,47
	GA ₄	-0,11	-0,16	-0,26	-0,24	-0,22	-0,23	-0,25
	AJ	-0,32	-0,21	-0,30	-0,16	-0,55*	-0,04	-0,27
	ABA	-0,06	-0,10	0,17	0,00	0,36	0,15	0,09
	AS	0,28	0,32	0,44	0,27	0,64**	0,14	0,44

Força da associação: -1,0 -0,7 -0,5 0 0,5 0,7 1,0

*,**,***: Valores significativos pelo teste de Pearson ($p < 0,1$; $< 0,05$; $< 0,01$, respectivamente).

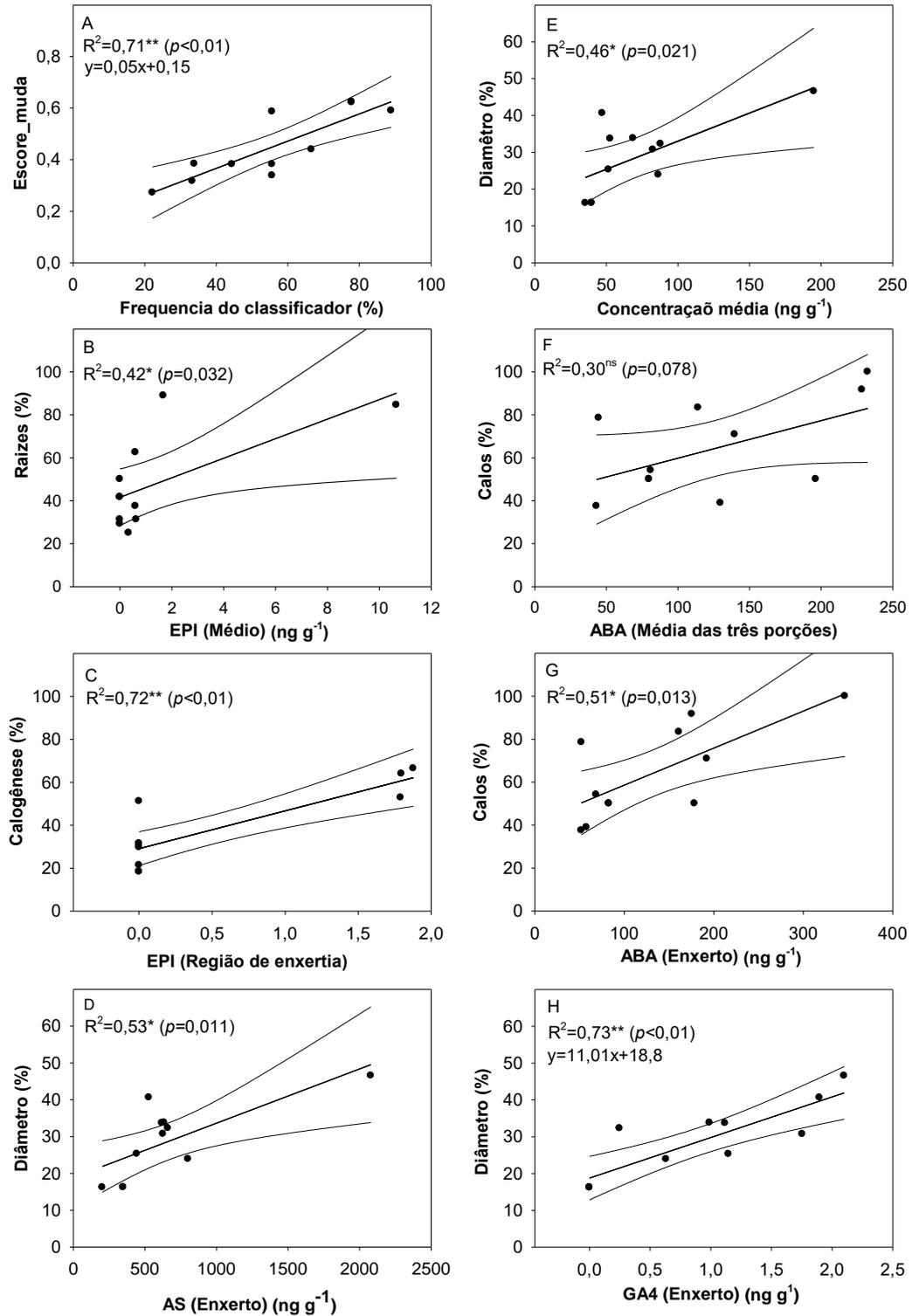


FIGURA 3. Gráficos de regressão ajustados sobre a resposta de diferentes variáveis fitotécnicas em função da: frequência do classificador multivariado 'peso acumulado' (A) e da concentração dos fitohormônios: AS(B), ABA(C), GA₄(D), GA₃(E), AIA(F), EPI(G), AJ(H) quantificados em diferentes porções da muda. *, ** e *ns*: significativo à 5%, 1% e não-significativo, respectivamente, pelo *f*-teste do modelo. ¹Intervalo de confiança da regressão à 95%.

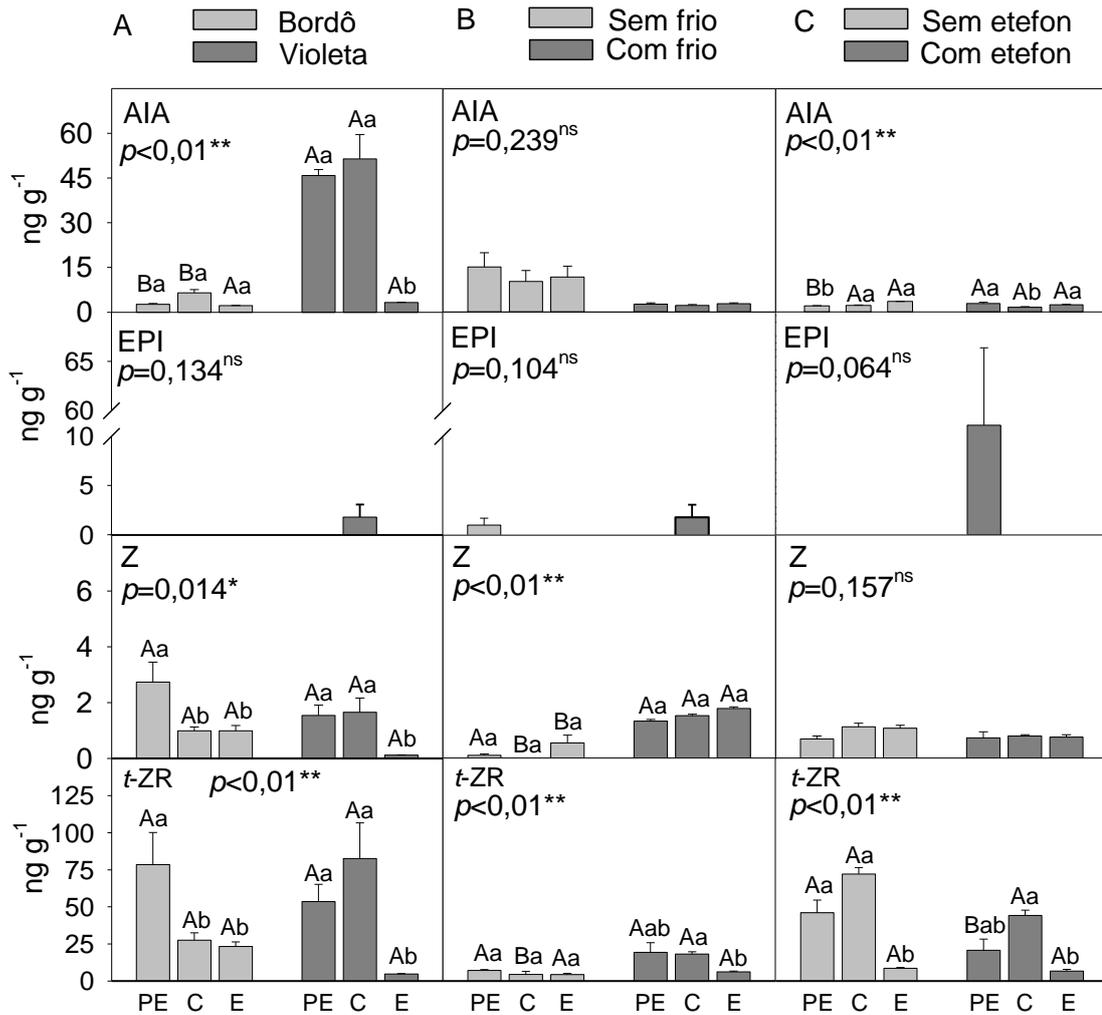


FIGURA 4. Gráficos de barras para a concentração (ng g^{-1}) de quatro fitohormônios (AIA, EPI, Z, t-ZR) determinados nas seguintes porções da muda: porta-enxerto (PE), corte da enxertia (C) e enxerto (E) para os contrastes: coleta em julho com exposição ao frio artificial (30 dias) em 'Bordô' e 'Violeta' (A); coleta em agosto, sem e com exposição ao frio artificial (60 dias) (B); coleta em maio com exposição ao frio artificial (90 dias) sem e com a utilização do etefon em abril (C). Letras maiúsculas comparam a mesma porção entre tratamentos e minúsculas diferentes porções no mesmo tratamento pelo teste de Kruskal-Wallis. *, ** e ns: significativo a 1%, 5% e não-significativo, respectivamente. ¹Erro padrão da média.

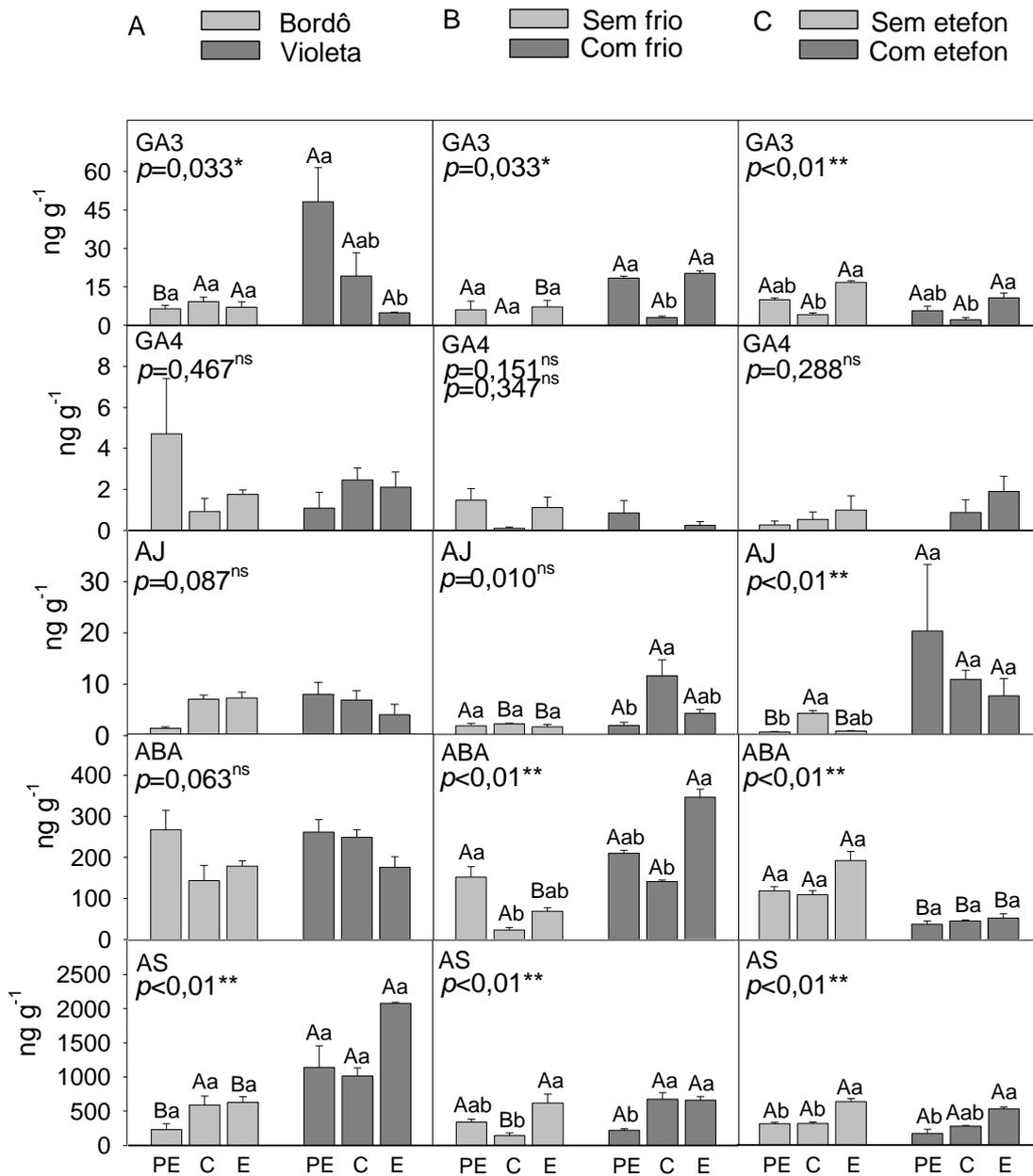


FIGURA 5. Gráficos de barras para a concentração (ng g⁻¹) de cinco fitohormônios (GA₃, GA₄, AJ, ABA, AS) determinados nas seguintes porções da muda: porta-enxerto (PE), corte da enxertia (C) e enxerto (E), para os contrastes: coleta em julho com exposição ao frio artificial (30 dias) em 'Bordô' e 'Violeta' (A); coleta em agosto, sem e com exposição ao frio artificial (60 dias) (B); coleta em maio com exposição ao frio artificial (90 dias) sem e com a utilização do etefon em abril (C). Letras maiúsculas comparam a mesma porção entre tratamentos e minúsculas diferentes porções no mesmo tratamento pelo teste de Kruskal-Wallis. *, ** e ns: significativo a 1%, 5% e não-significativo, respectivamente. ¹Erro padrão da média.

4.4 Discussão

As condições de manejo foram discriminadas entre si, de forma similar, tanto pelo perfil fitohormonal (Fig.2A1,B1,C1) como pela qualidade fitotécnica das mudas (Fig.2A2,B2,C2). Porém, dentro de cada experimento, os fitohormônios que favoreceram os maiores contrastes entre tratamentos (Fig.4 e 5), necessariamente, não foram os mesmos, conforme discutido a seguir.

No experimento 1, o perfil fitohormonal contrastou cultivares, sendo mais relevante a diferença entre 'Violeta' e 'Bordô' (Fig.2A1). Estas também apresentaram a maior e menor qualidade fitotécnica, respectivamente (Fig.2A2). Recentemente, o equilíbrio entre fitohormônios tem sido considerado na caracterização da compatibilidade de enxertia em videiras (Assunção *et al.* 2019). Conforme os autores, o crescimento de plantas em distintas combinações genéticas pôde ser contrastado pelo balanço entre seus fitohormônios. Os autores evidenciaram que os maiores índices de compatibilidade foram obtidos quando ocorreram maiores níveis de AIA e menores de ABA. Apesar da referência a cerca destes dois fitohormônios, uma caracterização dos demais, ainda carece de ser aprofundada. Neste trabalho, ocorrem maiores concentrações de AIA (nas porções da enxertia e do porta-enxerto) em 'Violeta' do que em 'Bordô' (Fig.4). Também, GA₃ (no porta-enxerto) e AS (no enxerto e porta-enxerto) se destacaram com maiores valores para 'Violeta' (Fig.5).

No experimento 2, o perfil fitohormonal isolou os fatores da interação épocas de coleta e exposição ao frio artificial (Fig.2B1). Dentro de cada época, a utilização do frio artificial foi o efeito principal, sendo ainda, discriminado como segundo efeito, a época de coleta. Já a qualidade das mudas discriminou essencialmente o efeito do frio artificial, que resultou em mudas superiores (Fig.2B2). Ou seja, as condições de manejo foram mais discriminadas pelo perfil fitohormonal do que pela qualidade fitotécnica. Em videiras, são clássicos os trabalhos que exploram o benefício do acúmulo de frio para superação da dormência e maior uniformidade de brotação (Koussa *et al.*, 1994; Noriega e Pérez, 2017; Zheng *et al.*, 2018). Ainda, especificamente, verificaram-se diferenças de ABA para a porção do enxerto, com maiores valores para as plantas submetidas ao frio artificial (Fig.5). Conforme estes autores, ABA é o fitohormônio fundamental nos processos de adaptação ao frio, controlando a indução e superação da dormência. Dentre seus efeitos está sua direta influência na biossíntese das auxinas e citocininas (Noriega e Pérez, 2017) modulando o crescimento vegetal. Também, mais recentemente, Orrantia-Araujo

et al. (2020), sugerem estreita relação entre os níveis de AS com a taxa de brotação das gemas na saída do período de dormência. Porém, neste trabalho AS diferenciou-se apenas entre as porções da enxertia, com maiores valores para a condição sob frio artificial (Fig.5).

No experimento 3, a variação entre épocas e uso do etefon foi percebida tanto pelo perfil fitohormonal (Fig.2C1), quanto pela qualidade fitotécnica (Fig.2C2). Neste caso, o tratamento com uso de etefon na condição de coleta antecipada, resultou em mudas superiores. Em videiras, trabalhos relacionados à utilização de etefon e fitohormônios são estudados especialmente na sua associação ao etileno (Lavee, 1984). Efeitos de etefon na alteração de um perfil fitohormonal mais amplo, em mudas de videiras, não são referenciados. Neste trabalho, ocorreram maiores concentrações de AJ (na porção do enxerto e porta-enxerto) (Fig.5) e menores de ABA na condição de uso do etefon.

Apesar de ocorrerem estas diferenças específicas para certos fitohormônios em cada experimento, destaca-se que, houve semelhante variação do perfil fitohormonal entre tratamentos. Isto foi evidenciado na análise da variável frequência do 'peso acumulado' (Tab.1). Neste caso, àqueles tratamentos que resultaram na maior qualidade fitotécnica, apresentaram maior quantidade fitohormônios com concentrações superiores aos tratamentos que resultaram na menor qualidade fitotécnica. Esta associação foi forte suficiente permitindo predizer o ganho em qualidade fitotécnica a partir do aumento da frequência do 'peso acumulado' (Fig.3A). Ou seja, as mudas com maior qualidade derivaram de um maior acúmulo na concentração total dos fitohormônios. A maior quantidade total de todos fitohormônios, ocorre pelo fato de serem compostos dependentes de uma síntese bioquímica (Taiz e Zeiger, 2009), o que indiretamente representa que os tecidos avaliados estão metabolicamente mais ativos do que aqueles com menor concentração total. De forma complementar, conforme Asselbergh *et al.* (2008), a resposta ao estresse é derivada de uma ação conjunta das diferentes classes de fitohormônios e não efeito de somente um especificamente. O evento da enxertia, sinaliza uma cascata de reações com intensa regulação e cruzamento entre inúmeros genes no período entre 3 e 80 dias após a enxertia (Coocson *et al.*, 2013; Assunção *et al.*, 2019). Por isto, os atuais modelos moleculares que buscam explorar os eventos relacionados à cicatrização da enxertia estão cada vez mais integrados, como por exemplo, Nanda e Melnick (2018), que se basearam na inter-

relação entre auxinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, giberelinas, ácido jasmônico e brassinosteróides.

A evidência de que a concentração acumulada dos fitohormônios define a qualidade fitotécnica, independente do experimento, indicou que a dinâmica dos fitohormônios entre tratamentos, pode estar mais associada ao processo de produção da muda como num todo, do que a situação de manejo que a originou. Neste caso, a seguir, serão apontadas as especificidades percebidas na dinâmica dos fitohormônios frente às diferentes qualidades fitotécnicas obtidas, bem como, ao longo das porções da muda.

ABA (43 a 232 ng g⁻¹) e AS (136 a 1411 ng g⁻¹) se apresentaram com as maiores concentrações dentre todos fitohormônios (Tab.1). O fato destes se manterem no mesmo grupo faz sentido, haja vista que ambos são considerados marcadores de estresses bióticos e abióticos. Assunção *et al.* (2019) verificaram que os genes associados ao estresse oxidativo e a resposta à cicatrização foram os mais expressos na região da enxertia em videiras. Estas são funções fisiológicas prioritariamente mediadas pelo ABA, em resposta sinalizada pelo corte (Nanda e Melnyk, 2018). Estes autores destacam que ABA atua diretamente na diminuição da capacidade de cicatrização e formação do calo de enxertia. Aumentos da concentração de ABA são relacionados à repressão dos genes de biossíntese das auxinas e citocininas, inibindo o crescimento de brotações (Noriega e Pérez, 2017). Já no caso de AS, sua ação está relacionada com a indução, modificação e transdução da sinalização dos genes de defesa das plantas (Chen *et al.*, 1995). A ativação de genes de defesa desencadeia uma série de efeitos negativos relacionados à enxertia, como a morte celular programada, que leva a queima oxidativa, resultado da elevação dos níveis de H₂O₂ (Klessig e Malamy, 1994).

Apesar das elevadas concentrações verificadas (Tab.1), os resultados obtidos com ABA e AS sugerem que suas funções deletérias à qualidade da enxertia não foram ativadas, pois estiveram altamente associados às variáveis da calogênese (Tab.2). Esta associação foi consistente a ponto das concentrações de ABA e AS, quantificados nos enxertos, serem aceitos como preditores do percentual de plantas com calos (Fig.3C) e do seu diâmetro (Fig.3B). Cabe salientar, que a maior parte dos fitohormônios apresenta função dupla, atuando como indutor e repressor de funções fisiológicas, dependendo da sua concentração (Aloni, 1980). Conforme Asselbergh *et al.* (2008), ABA está altamente envolvido nos processos de deposição de caloses, obstruindo feixes vasculares em locais de

dano nos tecidos, como resultado da ativação dos genes de defesa. Já AS, dentre suas funções, atua na ativação do fortalecimento ou enrijecimento das paredes celulares a partir da deposição de polímeros fenólicos, como as ligninas (Klessig e Malamy, 1994). Além disso, os fenóis também atuam como parte do mecanismo de defesa, evitando a incidência e ataque de patógenos durante a formação da muda (Rodrigues *et al.*, 2002).

Quanto à concentração nas diferentes porções da muda, observou-se que os valores de ABA e AS foram um pouco superiores nos enxertos (Fig.5). Além disso, foram os únicos que apresentaram relação com alguma variável da qualidade de mudas ao longo das três porções (Tab.3). Tal fato é indicativo de movimentos sistêmicos ao longo da muda. Neste caso, salienta-se que tanto ABA quanto AS estão envolvidos diretamente no processo de dormência e brotação das videiras. Por exemplo, no caso de ABA, conforme (Koussa *et al.*, 1994), a exposição de estacas submetidas ao frio intenso de câmara frigorífica leva a picos na sua concentração. Posteriormente, e de modo gradativo, esta exposição promove seu catabolismo, devido ao aumento dos genes responsáveis pela sua esterificação, especialmente pela atividade da catalase (Zheng *et al.*, 2018). No experimento 2, verificou-se que as mudas expostas ao frio artificial, independente da época, apresentaram maiores níveis de ABA (Tab.1A e Fig.5). Ou seja, mesmo com a condição de frio artificial ainda houve aumento de ABA, indicando que o frio acumulado no campo, possivelmente foi insuficiente até a realização das coletas. Portanto, pode-se supor que as concentrações de ABA e AS nos momentos de pré-enxertia eram ainda mais elevadas, tanto no enxerto quanto no porta-enxerto. Reforça-se, assim, a importância de trabalhos futuros que quantifiquem os níveis fitohormonais ainda nas etapas de anteriores a enxertia.

As auxinas são classificadas como fitohormônios fundamentais na mediação da cascata de reações ao longo da formação da enxertia a partir do corte (Enders e Streider, 2015). Em *Arabidopsis*, Yin *et al.* (2012) verificaram que, após 24h da enxertia, houve aumento no acúmulo de auxinas na região da conexão, sendo o primeiro grupo fitohormonal a expressar sua atividade. Apesar desta importância, nos resultados obtidos neste trabalho, a concentração de auxinas foi inferior ao de ABA e AS (Tab.1). Também, de forma consistente, nos três experimentos, o AIA não apresentou ocorrência relevante (com 'peso acumulado' negativo ou nulo) sobre as mudas de maior qualidade (Tab.1). Além disso, não se obteve associação entre auxina com as variáveis de qualidade fitotécnica (Tab.2). Frente a estas

evidências, pode-se supor que os menores valores de concentração verificados por ocasião da pós-forçagem, são atribuídos ao seu consumo ao longo da calogênese. Zheng *et al.* 2020 verificaram que AIA é o fitohormônio mais intensamente absorvido no início do processo de enxertia. Já Noriega e Pérez (2017), pontuam que na iminência da iniciação dos primórdios foliares as auxinas são canalizadas através das proteínas PIN à região MAC (Meristema Apical do Caule) para que a brotação seja induzida. Conforme estes autores, após o início da brotação aumenta a expressão dos genes responsáveis pela biossíntese de citocininas e auxinas. Mas a partir deste momento, também ocorre intensa redistribuição de auxinas aos tecidos relacionados aos processos de calogênese e enraizamento. Neste caso, as auxinas biossintetizadas na parte aérea passam a exercer seu movimento basipetal em direção à região do MAR (Meristema Apical Radicular) contribuindo para a indução e formação das raízes adventícias (Ljung *et al.*, 2005). Tal dinâmica foi evidenciada neste trabalho pela associação inversa entre a concentração de AIA no enxerto com as variáveis de brotação (Tab.3). Assim, o AIA acumulado no porta-enxerto e associado à calogênese (Tab.3), provavelmente foi derivado de fluxo basipetal e não resultado de maior concentração no porta-enxerto em si. Isto fica evidente na cultivar Violeta que apresentou uma concentração significativa de AIA no porta-enxerto em comparação ao enxerto (Fig.4). Esta nítida assimetria mesmo após 30 dias da enxertia, pode ser explicada a partir de Nanda e Melnyk (2018). Conforme os autores, após concluída a reconexão vascular, as auxinas ainda mantêm atividade na união, especialmente na manutenção da estabilidade dos tecidos do floema.

Os resultados com AIA indicam a necessidade de rever algumas práticas aplicadas nas mudas em pós-forçagem. Atualmente, ao final desta etapa, os brotos apicais já rustificados são decepados para a parafinação de plantio (Khun *et al.*, 2007). Tal fato é considerado necessário pelos autores, pois após a forçação ocorre elevado percentual de brotos estiolados devido à ausência de luz e, por ocasião do plantio, sua altura excessiva dificulta a operacionalização da prática. Contudo, os resultados indicam que este procedimento pode cessar de imediato o movimento basipetal das auxinas, inibindo ou restringindo a rizogênese e a estabilidade da reconexão vascular. Além disso, como grande parte das reservas do enxerto foram empregadas na formação dos primeiros brotos (durante a forçação), com o corte destes, após o plantio, as mudas podem não ter reservas suficientes para a ativação e formação de novas brotações. Este pode ser um dos

motivos pelos quais, o “pegamento” da enxertia (após a colheita das mudas) é estimado em valores que variam entre 50 a 70% do total plantado (Regina *et al.*, 2012).

Os ácidos giberélicos (GA's) são fitohormônios de ampla atuação fisiológica, envolvidos na divisão, diferenciação e proliferação celular (Nanda e Melnyk, 2018). Sharma e Zheng (2019) consideram o cruzamento das rotas de sinalização de auxinas, giberelinas e citocininas como a base para a reconexão vascular funcional pós-enxertia. Talvez por estarem na mesma rota bioquímica, GA₃ (variando de 4,1 a 24 ng g⁻¹) manteve-se no mesmo grupo de concentração fitohormonal de *t*-ZR e AIA (Tab.1). Por outro lado, GA₄ apresentou baixa concentração (0,4 a 2,5 ng g⁻¹) estando no mesmo grupo de Z (Tab.1). Este resultado corrobora ao verificado por Zheng *et al.*, (2018) que, dentre sete ácidos giberélicos avaliados, GA₄ foi a que apresentou indetectável nível de bioatividade. Ainda, conforme Eriksson *et al.* (2006), GA₄ é uma forma muito menos estável que GA₃, sendo rapidamente catalisada pelas GA₂-oxidases.

Neste trabalho, as giberelinas destacaram-se como marcadores diretos da qualidade de mudas, porém com intensidade inferior ao verificado em ABA e AS (Tab.1). Também, sua concentração média não esteve associada a nenhuma variável de qualidade (Tab.2). Mas ao se analisar sua concentração por porções da muda, destacaram-se associações positivas com variáveis da calogênese e enraizamento (Tab.3). Neste caso, GA₃ e GA₄ se diferenciaram quanto à porção da muda mais associada a estas variáveis fitotécnicas.

GA₃ apresentou aumento de concentração no sentido do porta-enxerto, seguindo o mesmo padrão que foi verificado em AIA (Tab.3). De forma mais expressiva, em 'Violeta', GA₃ apresentou redução na porção do enxerto em relação ao porta-enxerto (Fig.5). Desta forma, possivelmente aumentando-se a concentração de AIA nos brotos, aumentou-se também de GA₃. Posteriormente, ocorreu movimento basipetal de ambos em direção ao porta-enxerto. Esta evidência concorda com Zhou *et al.* (2020) que verificaram a redução dos níveis de GA₃ em gemas de videira de forma proporcional às auxinas. Conforme os autores, esta interdependência ocorre devido o cruzamento funcional entre estas classes de fitohormônios, sendo as auxinas responsáveis pela biossíntese e transporte das giberelinas na planta. Assim, GA₃ ocorre de forma aditiva e proporcional às auxinas, regulando a divisão celular e o crescimento secundário de tecidos vasculares.

Neste trabalho, esta função pôde ser evidenciada a partir da associação significativa do GA₃ no porta-enxerto com o diâmetro de calos (Tab.3).

No caso de GA₄, seu acúmulo no enxerto esteve diretamente associado à calogênese (Tab.3). Esta associação foi alta a ponto deste fitohormônio influenciar positivamente no próprio escore de qualidade (Tab.3) e ser destacado como preditor do diâmetro de calos (Fig.3D). Da mesma forma, sua variação entre porções na muda apresentou padrão diferenciado ao GA₃, estando mais próximo do verificado para ABA e AS, não havendo diferenças entre porções (Fig.5). Este comportamento sugere uma íntima relação de GA₄ com o processo de resposta ao estresse decorrente do ferimento da enxertia. Conforme Nanda e Melnyk (2018), a relação das giberelinas com o ferimento da enxertia ainda precisa ser melhor compreendida. Os autores indicam que, em resposta ao corte, as giberelinas parecem ser importantes na expansão das células na região do ferimento, seguido então pela atuação das auxinas na diferenciação celular para recuperação da vascularização.

As citocininas foram representadas neste trabalho por Z e *t*-ZR. A calogênese é determinada especialmente pelo balanço dos níveis endógenos de auxinas e citocininas entre enxerto e porta-enxerto (Köse e Gülerüç, 2016; Nanda e Melnyk, 2018; Baron *et al.*, 2019). Dentre as duas formas analisadas, *t*-ZR apresentou moderada concentração (5,3 a 47 ng g⁻¹) similar a AIA e GA₃ (Tab.1). Já Z apresentou a mais baixa concentração (0,2 a 1,5 ng g⁻¹) similar a GA₄ (Tab.1). As maiores concentrações de *t*-ZR em relação a Z são justificadas por sua forma de disponibilidade à planta. Z é a forma livre e ativa nas plantas, enquanto que *t*-ZR é uma forma conjugada com o açúcar ribose, a qual é convertida para forma livre somente quando necessário (Taiz e Zeiger, 2009).

Apesar desta diferença na concentração, ambas as formas, não apresentaram associação com nenhuma variável da qualidade, tanto para valores médios (Tab.2), quanto por porção (Tab.3). Por outro lado, pode-se destacar nestas citocininas, o mesmo padrão de fluxo basipetal verificado em AIA e GA₃ (Fig.4). Este padrão concorda com Baron *et al.* (2019), os quais determinaram como mais significativo efeito das citocininas a interação destas com a rota de sinalização das auxinas. Conforme os autores, as citocininas aumentam o transporte das auxinas durante a formação vascular pela regulação e distribuição das proteínas PIN. Ou seja, o movimento basipetal observado nas auxinas é precedido pela biossíntese das citocininas nos tecidos do meristema apical (MAC).

Outro fato que pode estar associado à baixa relação das citocininas à qualidade das mudas, refere-se a sua clássica relação antagonística com as auxinas (Pernisová *et al.*, 2011). Durante a calogênese o efeito das citocininas potencializa a ação das auxinas, especialmente no que se refere à expansão do calo, mas não o determina (Nanda e Melnyk, 2018; Sharma e Zheng, 2019). Conforme estes autores, o sucesso na ocorrência da enxertia é precedido pela obrigatoriedade da auxina. Ou seja, o efeito das citocininas só passa a ser predominante na formação da muda a partir da expansão do broto, mas não na etapa de reconexão vascular. Conforme, Zhou *et al.* (2020), apenas após 30 dias da enxertia, ocorre o aumento na concentração de Z nos brotos. Nos períodos anteriores, seus valores são similares ou menores que de AIA. Portanto, com quantificações em períodos posteriores à aclimação das plantas, esse hormônio poderá associar-se positivamente com citocininas e/ou variáveis fitotécnicas.

Os brassinosteróides são uma classe de fitohormônios ainda pouco considerada em estudos de enxertia (Nanda e Melnyk, 2018). Porém, de forma geral, estes autores destacam sua ampla atuação neste processo, agindo especialmente na diferenciação de traqueídeos e formação do xilema secundário. Ainda, conforme os autores, seus efeitos também podem estar associados na indução dos genes de resposta ao estresse, relacionado ao corte da enxertia. Os resultados obtidos evidenciaram EPI como o fitohormônio de mais baixa concentração nas plantas (0 a 10,7 ng g⁻¹) (Tab.1). Da mesma forma, sua associação com a qualidade de mudas variou de nula a negativa (Tab.1). Além disso, não apresentou correlação com as variáveis de calogênese e brotação (Tab.2) tendo padrão semelhante ao AIA e GA₃ (Tab.3). Neste caso, sua concentração no enxerto também se associou de forma negativa à calogênese. Zheng *et al.* (2019) comprovam em macieiras que brassinosteróides interagem de forma mútua e direta com auxinas e giberelinas. Conforme os autores, alterações na expressão molecular de brassinosteróides promovem proporcionais modificações de auxinas/giberelinas, sendo o contrário também verdadeiro.

Diferente de AIA e GA₃, um fato que deve ser ressaltado em EPI foi sua associação direta à formação de raízes, tanto na sua concentração média (Tab.2), quanto na sua concentração no enxerto e porta-enxerto (Tab.3). Esta associação foi forte a ponto de permitir a predição do enraizamento a partir da sua concentração média (Fig.3G). Os efeitos de brassinosteróides sobre o enraizamento foram elucidados por Müssig *et al.* (2003) em *Arabidopsis*. Conforme os autores,

brassinosteróides têm efeito aditivo às auxinas na alongação de raízes. Por outro lado, na sua ausência a capacidade de enraizamento não é inibida, indicando não ser um fitohormônio essencial neste processo.

Apesar da tendência de EPI em ter um fluxo basípetal (Tab.3), verificou-se baixa variação deste fitohormônio entre as porções (Fig.4). À exceção do experimento 3, em que houve um máximo na concentração do porta-enxerto pela utilização do etefon, seus valores foram inferiores a $1,0 \text{ ng g}^{-1}$ em todas as porções (Fig.4). Tal fato pode ter sido determinado pela menor sensibilidade de detecção deste fitohormônio durante a etapa analítica. Este é o caso mais evidente que adaptações da técnica LC poderão aumentar a sensibilidade na quantificação daqueles fitohormônios que ocorreram em baixas concentrações nos tecidos.

O ácido jasmônico (AJ) tem sido associado aos primeiros momentos da calogênese, sendo ativado durante estresses bióticos e abióticos, incluindo o ferimento do corte da enxertia (Nanda e Melnyk, 2018). Conforme estes autores, o AJ ainda carece de mais pesquisas para se definir sua importância ao longo do processo de enxertia. Neste trabalho, AJ foi o fitohormônio que se destacou pela elevada amplitude de valores entre os experimentos ($1,5$ a 116 ng g^{-1}) (Tab.1). Mesmo assim, da mesma forma que os demais, apresentou aumento de concentração nas mudas de maior qualidade (Tab.1). Porém, contrariamente aos demais, foi o único com tendência de uma associação negativa com a qualidade das mudas, especialmente no que se refere à calogênese (Tab.2). Esta tendência foi verificada ao analisar seu padrão ao longo das porções, evidenciando-se que a intensidade deste antagonismo aumentou no sentido basipetal (Tab.3). Foi o aumento das suas concentrações nas porções da enxertia no exp. 2 e 3 (Fig.4) que levaram às maiores correlações negativas com a qualidade (Tab.3). Ou seja, evidenciou-se um padrão duplo de AJ. Por um lado, as mudas de maior qualidade apresentaram maior concentração deste fitohormônio, mas por outro, esta maior presença aparentemente associou-se à queda desta qualidade.

Na literatura, relações entre AIA e AJ durante a enxertia são reportados por Nanda e Melnyk (2018). Os autores destacam que ocorre acúmulo de AJ abaixo do ponto de enxertia, pois sua biossíntese é estimulada pela restrição do movimento basipetal da auxina. Por outro lado, acima deste ponto ocorre o acúmulo de auxinas pela expressão deste gene. O desbalanço no acúmulo de auxinas entre enxerto e porta-enxerto é a sinalização básica para o início do processo de calogênese. Os resultados obtidos por este trabalho indicam que, mesmo após a forçagem, esta

relação ainda persiste. Ou seja, no início do plantio, possivelmente, os processos bioquímicos e morfológicos de fusão dos tecidos e reconexão vascular ainda não estão totalmente concluídos.

Destaca-se ainda que o acúmulo de AJ na porção do porta-enxerto, possivelmente decorre também de movimento basípeto deste hormônio. Conforme Gasperini *et al.* (2008), sob situações de estresse, como o corte da enxertia, a biossíntese de AJ é ativada. Suas moléculas (oxilipinas) apresentam elevada capacidade de transporte axial (brotos-raízes) e radial (célula-à-célula), acumulando-se especialmente na região do corte dos tecidos. Ainda, conforme os autores, a maior contribuição do fornecimento do AJ às demais regiões da planta é o broto fotossinteticamente ativo. Novamente, fica evidenciado que a elevada perda de mudas ao longo do enraizamento, decorre de um processo de reconexão vascular incompleto por ocasião do plantio de mudas sem a presença de brotos funcionais.

Finalmente, os resultados obtidos neste trabalho reforçam o potencial da metodologia de quantificação fitohormonal para caracterização fisiológica de plantas submetidas às diferentes condições de manejo. Em exemplo de uso prático desta abordagem em mudas de videiras, Zhou *et al.* (2020), quantificaram ABA, AIA, GA₃ e *t*-ZR utilizando HPLC-UV/Vis para otimização de compostos indutores da fusão de enxertia. Da mesma forma, recentemente, têm-se atribuído situações de incompatibilidade em videira aos eventos que ocorrem antes e durante a enxertia. Por exemplo, Tedesco *et al.* (2020), verificaram elevada correlação entre o “pegamento” final de mudas com a taxa de formação de calos após três semanas da enxertia. Apesar das potencialidades da ferramenta, cabe ressaltar que, nas quantificações hormonais, pelo fato de envolver compostos com níveis muito baixos nos tecidos, podem não haver a expressão de toda a amplitude real das variações em função do tipo de tecido ou tratamento. Ou seja, o equipamento e os procedimentos experimentais adotados neste trabalho podem ter limites de detecção. Com a contínua evolução da metodologia analítica e dos equipamentos, maior sensibilidade de detecção tende a ser agregada e, possivelmente muitas variações verificadas em alguns compostos (EPI, por exemplo) poderão se apresentar com mais expressão.

4.5 Conclusões

A qualidade fitotécnica de mudas quando amostradas na pós-forçagem, está diretamente associada à maior concentração de fitohormônios nos tecidos lignificados, na média das porções do enxerto, enxertia e porta-enxerto.

ABA, AS, GA₃ e GA₄ se destacam na associação à qualidade fitotécnica das mudas, especialmente ao diâmetro dos calos. Destes, ABA, AS e GA₄, na porção do enxerto, são potenciais preditores desta qualidade em pós-forçagem.

AIA, EPI, Z, *t*-ZR e AJ não apresentam associação direta com a qualidade fitotécnica das mudas. AIA apresenta tendência de concentração no enxerto oposta à qualidade da muda. Já EPI, tanto no enxerto como no porta-enxerto, apresenta associação apenas com enraizamento. Z e *t*-ZR não apresentam associação com a qualidade para nenhuma porção. AJ acumulado especialmente no porta-enxerto apresenta associação inversa com a calogênese.

4.6 Referências bibliográficas

ALONI, R. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. **Planta**, Bonn, v. 150, p. 255-263, 1980.

ASSUNÇÃO, M. *et al.* Graft compatibility of *Vitis* spp.: the role of phenolic acids and flavanols. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 207, p. 140-145, 2016.

ASSUNÇÃO, M. P. *et al.* Gallic acid, sinapic acid and catechin as potential chemical markers of *Vitis* graft success. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 246, p. 129-135, 2019.

ASSELBERGH, B.; VLEESSCHAUWER, D. de; HÖFTE MONICA. Global Switches and Fine-Tuning-ABA Modulates Plant Pathogen Defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Vermont, v. 21, n. 6, p. 709-719, 2008.

BARON, D. *et al.* An overview of grafting re-establishment in woody fruit species. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 243, p. 84-91, 2019.

CELIK, H. The effects of different grafting methods applied by manual grafting units on grafting success in grapevines. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 24, p. 499-504, 2000.

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

CHEN, Z. *et al.* Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Illinois, v. 92, n. 10, p. 4134-4137, 1995.

CUI, K. *et al.* Comparison of sample pretreatment methods for the determination of multiple phytohormones in plant samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, Valência, v. 121, p. 25-31, 2015.

EICHORN, K. W.; LORENZ, D. H. Phaenologische entwicklungsstadien der rebe nachrichtemblaest. **Pflanzenschutzdienstes**, Braunschweig, v. 29, p. 119-120, 1977.

ENDERS, T. A; STRADER, L. C. Auxin activity: past, present, and future. **American Journal Botanic**, Connecticut, v. 102, n. 2, p. 180-196, 2015.

ERIKSSON, S. *et al.* GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation. **Plant Cell**, Missouri, v. 18, n. 9, p. 2172-2181, 2006.

GARIGHAN, J. de A. **Quantificação de hormônios durante a dormência de gemas de macieira**. 2017. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

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

GOUSSARD, P. G. Effect of hot-water treatments on vine cuttings and one-year-old Graits. **Vitis**, Siebeldingen, n. 16, p. 272-278, 1977.

HELFER, G. A. *et al.* Chemostat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 475-579, 2015.

KLESSIG, D. F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, Düsseldorf, v. 26, p. 1439-1458, 1994.

KOUSSA, T.; BROQUEDIS, M.; BOUARD, J. Importance de l'acide abscissique dans le développement des bourgeons latents de vigne (*Vitis vinifera* L. var. Merlot) et plus particulièrement dans la levée de dormance. **Vitis**, Siebeldingen, v. 33, p. 63-67, 1994.

KÖSE, C.; GÜLERYÜZ, M. Effects of auxins and cytokinins on graft union of grapevine (*Vitis vinifera*). **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 34, n. 2, p.145-150, 2016.

KÖSEA, B.; ÇELİKA, H.; KARABULUTB, B. Determination of calosing performance and vine sapling characteristics on different rootstocks of 'Merzifon Karası' grape variety (*Vitis vinifera*). **Anadolu Journal of Agricultural Sciences**, Anadolu, v. 30, p. 87-94, 2015.

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

KUHN, G. B. **Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado**: preparação da muda. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. (Sistemas de Produção, 4). Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/muda.htm>> Acesso em: 12 jan. 2020.

LAJEUNESSE, M. On the meta-analysis of response ratios for studies with correlated and multi-group designs. **Ecology**, Washington, v. 92. p. 2049-2055, 2011.

LAVEE, S. Ethephon action in growth and abscission control. In: FUCHS Y., CHALUTZ E. (Ed.) **Ethylene**: biochemical, physiological and applied aspects. Dordrecht: Springer, 1984. (Advances in Agricultural Biotechnology) p. 255-266.

LJUNG, K. *et al.* Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 17, n. 4, p. 1090-1104, 2005.

MÜSSIG, C. *et al.* Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 133, p. 1261-1271, 2003.

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

NORIEGA, X.; PÉREZ, F. J. ABA biosynthesis genes are down-regulated while auxin and cytokinin biosynthesis genes are up-regulated during the release of grapevine buds from endodormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**, Van Godewijkstraat, v. 36, n. 4, p. 814-823, 2017.

ORRANTIA-ARAUJO, M. A. *et al.* Changes in the endogenous content and gene expression of salicylic acid correlate with grapevine bud dormancy release. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dresden, 2020. Disponível em: Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10100-9>. Acesso em: 06 ago. 2020.

PORIKA, H. K. *et al.* Graft compatibility-incompatibility in fruit crops: mechanism and determination techniques. **The Asian Journal of Horticulture**, Tajh, v. 11, n. 1, p. 252-256, 2016.

PERNISOVÁ, M.; KUDEROVÁ, A.; HEJÁTKO, J. Cytokinin and auxin interactions in plant development: metabolism, signalling, transport and gene expression. **Current Protein and Peptide Science**, Gainesville, v. 12, n. 137, p. 137-147, 2011.

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

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

REGINA, M. A.; SOUZA, C. R.; DIAS, F. A. N. Propagação de *Vitis* spp. pela enxertia de mesa utilizando diferentes porta-enxertos e auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 897-904, 2012.

RODRIGUES, A. C. *et al.* Peroxidases e fenóis totais em tecidos de porta-enxertos de *Prunus* sp. nos períodos de crescimento vegetativo e de dormência. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 559-564, 2002.

SANTAROSA, E. *et al.* Alterações anatômicas do sistema vascular em porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 4, p. 320-329, 2016.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TEDESCO, S. *et al.* A Phenotypic Search on Graft Compatibility in Grapevine **Agronomy**, Basel, v. 10, n. 5, p. 1-20, 2020.

YIN, H. *et al.* Graft-union development: a delicate process that involves cell–cell communication between scion and stock for local auxin accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 63, p. 4219-4232, 2012.

WAITE, H.; WHITELAW-WECKERT, M.; TORLEY, P. Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine planting material. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 43, n. 2, p. 144-161, 2015.

ZHENG, C. *et al.* Distinct gibberellin functions during and after grapevine bud dormancy release. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 69, n. 7, p. 1635-1648, 2018.

ZHENG, C. *et al.* Effects of Brassinosteroid Associated with Auxin and Gibberellin on Apple Tree Growth and Gene Expression Patterns. **Horticultural Plant Journal**. Beijing, v. 5, n. 3, p. 93-108, 2019.

ZHOU, Q. *et al.* Effects of exogenous growth regulators and bud picking on grafting of grapevine hard branches. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 264, 109186, 2020.

5 CAPITULO 3

Prospecção de formulações com reguladores de crescimento a partir do co-cultivo de calos *in vitro* para indução da enxertia *in vivo* em videiras*

5.1 Introdução

A vitivinicultura no Brasil se distribui em uma área de 75.951 ha (Mello e Machado, 2017), ocupando a 19ª posição no ranking mundial de área cultivada e a 14ª em produção de uvas (Mello, 2016). Apesar de comparativamente menor em relação a países com tradição na cultura, o setor vem gradativamente se qualificando, na medida em que ocorre o reconhecimento dos produtos no mercado interno e externo (Zanus, 2016). Assim, diversas práticas estão em processo de remodelação e, dentre estas, destaca-se a produção de mudas. Tradicionalmente esta era feita a partir do material vegetal obtido na propriedade do viticultor (Nachtigal e Schneider, 2007). Porém, têm se intensificado a busca por mudas comerciais produzidas por viveiristas. Apenas no Rio Grande do Sul (maior estado produtor de uvas no Brasil) o número de unidades produzidas em viveiros comerciais cresceu 22% no período de 2008 a 2015 (Mello e Machado, 2017). Dentre as causas desta mudança, destacam-se, além de aspectos sociais (ex. redução da mão-de-obra no campo), os fitotécnicos (ex. sanidade da muda). Apesar deste cenário promissor, os sistemas de produção de mudas nos viveiros nacionais ainda se encontram distantes do modelo ideal, pois prioritariamente adotam a “enxertia manual de garfagem”. Em contrapartida, nos principais países com tradição vitícola, o sistema de “enxertia de mesa do tipo ômega” tem sido o mais difundido e empregado desde a década de 1960 (Regina, 2002). Em relação ao sistema manual de garfagem, a enxertia de mesa permite, além de maior rendimento e menor necessidade de mão de obra, maior percentual de mudas dentro de um padrão morfológico uniforme, elevando seu status de qualidade (Kuhn *et al.*, 2007; Waite *et al.*, 2015).

* O capítulo III foi encaminhado de forma integral a revista *Plant Biosystems* e sua formatação está conforme as normas da revista.

A muda, para ser considerada funcional, exige a existência da conexão vascular entre enxerto e porta-enxerto, determinada a partir da formação equilibrada do calo de enxertia (Jonard *et al.*, 1990). O calo é definido como uma massa irregular de células do parênquima em diferentes estádios de lignificação (Pina *et al.*, 2009). A formação de calos (calogênese) é especialmente determinada pelo balanço dos níveis endógenos dos fitohormônios entre enxerto e porta-enxerto. Dentre estes fitohormônios, a relação entre auxinas e citocininas é a mais importante (Nanda e Melnyk, 2018; Baron *et al.*, 2019). Qualquer desbalanço entre estes dois fitohormônios induz ao desequilíbrio na calogênese e restringe as conexões vasculares do xilema e floema. Por este motivo, no sistema de enxertia de mesa, imediatamente após a enxertia, é recomendada a parafinação com ceras ricas em reguladores de crescimento, que modulam o balanço entre auxinas e citocininas. Em geral, estas ceras comerciais são enriquecidas com reguladores de crescimento do grupo das auxinas, sendo utilizado principalmente o DBA (ácido 2,5-diclobenzóico).

O emprego de reguladores de crescimento tem sido considerado como um fator determinante na garantia de indução da calogênese e sucesso de conexão vascular nas combinações de enxerto (E) e porta-enxerto (PE) na enxertia de mesa (Waite *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2020). Apesar desta importância, no Brasil, ainda não se dispõe da produção nacional de ceras enriquecidas com reguladores de crescimento, sendo um insumo importado, especialmente de países da Europa. Além do custo elevado, estas ceras têm promovido resultados muito variáveis, devido os diferentes genótipos que são empregados nas combinações E/PE. Como exemplo, com a cultivar europeia Chardonnay, Regina *et al.* (2012) obtiveram índices de sobrevivência de mudas que variaram de 8 a 74%, quando enxertada em treze diferentes variedades de porta-enxertos. Estes índices tendem a ser mais distintos ainda quando se considera a diversidade de cultivares-copa que são enxertadas no Brasil, desde *Vitis vinifera* (ex. 'Riesling') a *Vitis labrusca* (ex. 'Bordô'). A diversidade também ocorre em porta-enxertos, sendo utilizados desde cultivares de alta capacidade de enraizamento e afinidade de enxertia (ex. 'Paulsen1103') até aqueles recalcitrantes (ex. 'VR043-43').

Portanto, para que ocorra uma ampla adesão ao sistema de enxertia de mesa pelos viveiristas nacionais, torna-se necessário o desenvolvimento/ajuste de novas formulações (ceras ou soluções) com reguladores de crescimento. No Brasil, trabalhos com este intuito ainda são escassos. Entretanto, em outras regiões

vitícolas do mundo, têm sido desenvolvidos trabalhos para o ajuste local de formulações. Na Bulgária, por exemplo, Iliev *et al.* (2014) obtiveram valores de mudas viáveis de 90% e 66% com cultivares locais de videira, quando utilizaram ceras enriquecidas com auxinas e originadas da França e Espanha, respectivamente. Nestes trabalhos, cabe destacar ainda que, além das auxinas, novos grupos químicos também têm sido explorados como cofatores da calogênese, auxiliando na formação de brotos, calos ou raízes (Souza e Pereira, 2007). Dentre estes, tem-se destacado alguns compostos fenólicos (ex. hidroquinona e floroglucinol), que podem estimular a biossíntese de auxinas ou atuar como substrato alternativo para enzima AIA-oxidase, aumentando a disponibilidade deste fitohormônio (Mierziak *et al.*, 2014).

Apesar da importância prática destas formulações para enxertia e qualidade de muda, destaca-se que os ensaios para a prospecção de reguladores de crescimento, bem como, o ajuste de doses e misturas exigem uma estratégia complexa de experimentação. Isso fica evidente na projeção de ensaios *in vivo* a partir de fatoriais completos, os quais demandam experimentos onerosos, com grande número de interações (Gabrielsson *et al.*, 2002). Para contornar esse problema, os ensaios *in vitro* (cultura de tecidos) têm se apresentado como uma estratégia eficaz em outras culturas, favorecendo a prospecção de aditivos químicos com alto rendimento analítico e menor demanda de espaço e tempo (Matos, 1997). Dentre as técnicas *in vitro*, salienta-se o co-cultivo de calos entre espécies ou cultivares tem sido utilizado com êxito em estudos anatômicos (Pina *et al.*, 2009) e moleculares (Liu *et al.*, 2018). Calos co-cultivados consistem em tecidos aglomerados não diferenciados, obtidos a partir de explantes vegetativos, os quais expõem uniformização fisiológica e resultados mais próximos do efeito genético puro (Jonard *et al.*, 1990). Tradicionalmente, os ensaios de co-cultivo se apresentam como ferramentas importantes em estudos de predição e de caracterização da incompatibilidade de enxertia em espécies frutíferas (Errea *et al.*, 2001; Pedersen, 2006). Nestes trabalhos, para que ocorra a plena fusão dos calos é necessário o ajuste do meio de cultivo, principalmente nos tipos e doses de reguladores de crescimento. Em videiras, a aplicação desta técnica *in vitro* em uma abordagem mais ampla e relacionada com a qualidade de mudas *in vivo* é inovadora. Neste trabalho, objetivou-se testar a viabilidade de uso da técnica co-cultivo de calos *in vitro*, para prospecção preliminar de formulações promissoras de reguladores de crescimento na calogênese de enxertia *in vivo* em videira. Havendo sucesso nesta

abordagem serão obtidos compostos e doses para indução de calogênese em diferentes combinações enxerto/porta-enxerto para o sistema de enxertia de mesa.

5.2 Material e Métodos

Neste trabalho adotaram-se duas estratégias de ações: 1) prospecção *in vitro*, com três etapas experimentais e 2) validação *in vivo*, com uma etapa. Estas ações foram conduzidas ao longo dos anos de 2018 e 2019 na cidade de Bento Gonçalves, Brasil. Cada etapa experimental definiu os tratamentos a serem mantidos na próxima, até a fase de validação *in vivo*. Na sequência estão descritas as etapas experimentais, nas respectivas ações.

1. Prospecção (ensaios *in vitro*)

Para os experimentos desta ação, foram empregados calos obtidos pela técnica do co-cultivo *in vitro*. Estacas de cada cultivar foram coletadas em estágio lenhoso nas plantas matrizes no mês de julho (plantas em dormência) e enraizadas em vasos até obtenção das brotações. O cultivo *in vitro* dos calos isolados, para cada genótipo, foi baseado em protocolo adaptado de Khan *et al.* (2015). Segmentos nodais individuais foram obtidos das porções apicais das brotações (≈ 10 mm) e inseridos em frascos (em média, cinco segmentos por planta) contendo 12 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,0 mg l⁻¹ de BAP (solidificados com 0,6% de ágar em pH 5,8). Os segmentos foram mantidos em câmara de crescimento regulada para temperatura de 23±2°C e fotoperíodo de 16 horas, até a formação de calo basal. Após este período, os calos na extremidade basal das plântulas foram retirados e armazenados no mesmo meio descrito anteriormente até o momento do ensaio de co-cultivo, constituindo o banco de trabalho. Para os ensaios, utilizaram-se estruturas de 3 a 5 mm retiradas da parte interna dos calos, conforme metodologia descrita por Jonard *et al.* (1990). O calo do enxerto foi aproximado ao do porta-enxerto para indução da fusão. O meio utilizado foi o mesmo da etapa anterior (mas sem a utilização do BAP), sendo o regulador de crescimento adicionado de acordo com o tratamento previsto. Os ensaios foram conduzidos ao longo de 30 dias, em câmara de crescimento, regulada para temperatura de 28±1°C e sem complementação luminosa. Esta condição de crescimento foi modulada com base no que foi utilizado durante a forçagem das mudas *in vivo*, buscando representar a condição em que as formulações prospectadas foram validadas. Destaca-se que,

nas três etapas a seguir, a unidade experimental foi representada pela fusão enxerto/porta-enxerto, sendo empregados oito repetições por tratamento.

Etapa 1.1 Seleção de compostos

O ensaio foi aplicado sobre a fusão de calos de 'Riesling Itálico' (*Vitis vinifera*) e 'SO4' (híbrido de *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*), respectivamente, como enxerto e porta-enxerto. A escolha desta combinação genética baseou-se em três condições: 1º) a representação destes genótipos no setor vitivinícola nacional; 2º) apresentarem histórico de rendimento de mudas entre moderado e baixo. Conforme, Vršiča *et al.* (2015) a obtenção de mudas com calos de enxertia completos nestas cultivares foi moderado; 3º) terem disponibilidade de registros bibliográficos sobre a capacidade de formação *in vitro* de calos isolados. Conforme Jiménez e Bangerth (2000) 'Riesling' apresenta baixa capacidade morfogênica em induzir e formar calos *in vitro*. Já, em 'SO4' esta capacidade é moderada (Clog, 1990). A literatura não contempla formulações específicas do meio de cultura para o co-cultivo de calos nesta combinação genética. Assim, compostos candidatos e doses de referência, foram obtidos a partir de trabalhos de indução de calos isolados em diversas cultivares (Clog, 1990; Mii *et al.*, 1991; Srng e Brar, 1993; Jiménez e Bangerth, 2000; Aazami, 2010; Khan *et al.*, 2015; Kumsa, 2017). Destes protocolos, foram estabelecidos os seguintes compostos/reguladores de crescimento: AIB (ácido indolbutírico), AIA (ácido indolacético), DBA (ácido 2,5 diclorobenzóico), BAP (6-benzilaminopurina), CIN (cinetina), HID (hidroquinona) e FLO (floroglucinol). Quanto as doses, nestes protocolos, a faixa para cada composto variou de 1 a 10 mg l⁻¹ conforme a cultivar estudada. Desta forma, se optou por submeter cada composto a uma dosagem referência (5 mg l⁻¹) e contrastado ao tratamento CONTROLE (dose zero). Assim, nesta etapa, os tratamentos foram aplicados em esquema fatorial completo 7x2, dispostos em delineamento completamente casualizado.

Etapa 1.2 Otimização de doses nos compostos selecionados

Após a seleção dos compostos mais efetivos para o co-cultivo de 'Riesling'/'SO4', buscou-se a otimização da dose referência a fim de verificar a possibilidade de maximizar os resultados nesta combinação genética. Para isto, para cada composto, foi aplicado o delineamento de Doehlert (Gabrielsson *et al.*, 2002). Neste delineamento, a partir da dose referência, as próximas testadas foram

definidas de forma progressiva, ou seja, considerando-se os limites mínimos (1/2x) e máximos (2x) da dose mais efetiva do ensaio anterior. Assim, os ensaios foram progressivamente repetidos no tempo, até que fosse atingida a dose otimizada, relacionada à maior fusão de calos em relação ao CONTROLE.

Etapa 1.3 Obtenção de formulações candidatas

Nesta etapa buscou-se a mistura dos compostos selecionados (etapa 1.1) com suas doses otimizadas (etapa 1.2), a fim de obter formulações candidatas com eventuais efeitos sinérgicos ou aditivos no co-cultivo dos calos de 'Riesling'/'SO4'. Concomitantemente, estas formulações também foram aplicadas em outras combinações E/PE, a fim de verificar a capacidade de ajuste genético da formulação candidata. Os tratamentos foram aplicados em esquema fatorial, dispostos no delineamento completamente casualizado, sendo o FATOR 1 (formulações): compostos isolados obtidos a partir dos resultados da etapa 1.2 e misturados entre si; FATOR 2 (combinações E/PE): 'Riesling'/'VR043-43' (*Vitis rotundifolia* x *Vitis vinifera*), 'Riesling'/'P1103' (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*), 'Bordô' (*Vitis labrusca*)/'SO4', 'Bordô'/'VR043-43' e 'Bordô'/'P1103'.

2. Validação (ensaio in vivo)

Para os experimentos desta ação, as formulações candidatas foram ajustadas para aplicações em plantas, de modo que, a formulação candidata considerada efetiva em aumentar a qualidade das mudas foi denominada promissora. Utilizou-se o sistema de enxertia de mesa, baseado no protocolo definido por Regina (2002) e Kuhn *et al.* (2007) e resumido a seguir. Estacas lenhosas foram coletadas no jardim clonal no mês de julho, sendo mantidas envoltas em filme plástico e armazenadas em câmara frigorífica ($3\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 60 dias até o momento da enxertia. Posteriormente, as enxertias foram realizadas com máquina semi-automatizada tipo ômega. Após, as combinações de estacas enxertadas foram colocadas em caixas contendo vermiculita umedecida no fundo (3 cm de camada) e fechadas com filme plástico para manutenção da umidade acima de 85%. As caixas foram submetidas à forçagem em câmara de crescimento sem iluminação, regulada com temperatura entre 27 e 28°C, durante o período de 30 dias. Nas estacas enxertadas, as combinações E/PE que receberam o tratamento denominado formulação PADRÃO, foi utilizada a cera comercial contendo 0,01% de oxyquinolinona e 0,00175% de DBA. Esta foi previamente

derretida (67°C) e aplicada logo após a enxertia, imergindo na cera (1 a 2s) a porção do enxerto e do corte de enxertia, seguido das mesmas condições de forçagem.

Nas estacas enxertadas que receberam a aplicação das formulações candidatas não foi realizada a parafinagem, sendo efetuada diretamente, por aspersão até o escorrimento, a cada três dias, durante a forçagem. Previamente, as doses de cada regulador de crescimento das formulações candidatas foram dissolvidas em NaOH 1 M (para as auxinas) e HCl 1 M (para citocininas). Posteriormente, foram diluídas em água destilada no volume de 1 L e mantidas refrigeradas ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) até a utilização.

Etapa 2.1 Obtenção de formulações promissoras

Os tratamentos foram aplicados em esquema fatorial dispostos no delineamento completamente casualizado. O FATOR 1 representa as seguintes formulações validadas: a) candidatas: obtidas a partir do resultado da etapa 1.3; b) PADRÃO (cera comercial); c) CONTROLE (sem aplicação de qualquer regulador de crescimento). O FATOR 2 representa as combinações genéticas (utilizadas as mesmas da etapa 1.3). Ressalta-se que, apenas em 'Riesling'/'SO4', foram validadas formulações isoladas e em mistura entre si. Para as demais combinações genéticas, foram validadas apenas aquelas definidas como candidatas. A unidade experimental foi representada pela combinação E/PE, sendo adotados 30 repetições por tratamento.

3. Avaliações e análises estatísticas

Na prospecção *in vitro*, após 30 dias de co-cultivo, cinco variáveis da qualidade de calos fusionados foram avaliadas: (1) nota da fusão (Jonard *et al.*, 1990), em que: 1 = calos que permanecem separados, 2 = fusão incompleta e 3 = fusão completa; (2) nota de crescimento do calo do enxerto e (3) do porta-enxerto, em que: 1 = calo sem crescimento, 2 = calo com crescimento moderado, 3 = calo com crescimento acentuado; (4) percentual sem oxidação (adaptado de Srngh e Brar, 1993), em que o maior percentual representa a massa mais branca, sólida e brilhante de calos fusionados; (5) massa dos calos cofusionados (mg). Na validação *in vivo*, após 30 dias de forçagem, no período de aclimação para plantio (duração de cinco dias), seis variáveis da qualidade de mudas foram avaliadas: frequência de ocorrência de mudas com presença de: (1) calo de enxertia, (2) brotos e (3) raízes; (4) taxa de formação do calo (%) (Celik, 2000), em que: quanto maior o

percentual, mais completa a formação do calo no entorno do ponto de união da enxertia; (5) diâmetro frontal do calo (mm) no ponto de união da enxertia; (6) estágio de desenvolvimento da brotação (escala Eichorn e Lorenz, 1977).

Como estratégia de análise estatística, considerou-se uma abordagem conjunta dos dados resultantes das variáveis da qualidade, a partir dos conceitos de meta-análise (Lajeunesse, 2011). Por este, foram gerados os seguintes indicadores, com função de agregar as variáveis da qualidade na forma dos estimadores da tendência central: 'taxa de resposta do tratamento em relação ao CONTROLE – RC', 'CONTROLE relativo – C', 'peso acumulado na PCA' e 'classificador multivariado'.

O indicador 'RC' foi utilizado para avaliar o desempenho das formulações em induzir calos *in vitro* (etapa 1.3) e formar mudas *in vivo* (etapa 2.1), conforme a sequência de cálculos: 1º) obtenção: o valor absoluto de uma variável de qualidade, na mesma formulação e combinação genética, foi dividido pelo CONTROLE; 2º) relativização: o RC de uma formulação foi dividido pelo RC máximo dentre todas, na mesma combinação genética. Com esta relativização, minimizou-se o efeito de escala entre as variáveis de qualidade; 3º) RC médio: média dos RC's relativos das variáveis de qualidade (cinco na etapa 1.3 e seis na 2.1). Este indicador expõe o comportamento geral das variáveis da qualidade em comparação ao CONTROLE. Quanto mais acima de zero e próximo ao valor 1, maior a capacidade da formulação em induzir calos ou formar mudas em comparação ao CONTROLE. Na prospecção *in vitro* e validação *in vivo*, o RC foi denominado de $RC_{in vitro}$ e $RC_{in vivo}$, respectivamente.

O indicador 'C' foi utilizado para avaliar a qualidade da muda na sua condição original, sem interferência do efeito proporcionado pelas formulações, refletindo a condição genética da combinação E/PE. Seu cálculo foi adaptado de Varvel (2000), onde o valor absoluto do CONTROLE de certa variável de qualidade foi relativizado em relação às demais formulações testadas na mesma combinação genética. Posteriormente, foi realizada a média dos C's relativos no total de variáveis. Quanto mais acima de zero e próximo do valor 1 estiver o 'C', maior a capacidade da combinação genética em induzir calos ou formar mudas, sem a necessidade de utilização de formulações. Na prospecção *in vitro* e validação *in vivo*, o 'C' foi denominado de $C_{in vitro}$ e $C_{in vivo}$, respectivamente.

Após o cálculo do $RC_{in vitro}$ foi realizada a ação de prospecção por meio da análise exploratória multivariada, aplicando-se o método dos componentes

principais (PCA – *Principal Components Analysis*). Para adequação dos valores $RC_{in vitro}$ à PCA, estes foram centrados à média, integrando os ‘escores’ dos reguladores de crescimento com os ‘pesos’ das variáveis da qualidade. Para o contraste de grupos independentes na espacialização da PCA, foram ajustadas barras de desvio padrão múltiplo ($\pm 2\sigma$). Ao se contrastar os grupos, aqueles que não se sobrepuseram vertical ou horizontalmente, foram considerados distintos.

Posteriormente, na definição das formulações candidatas (etapa 1.3) e promissoras (etapa 2.1) foi utilizado o indicador ‘classificador multivariado’. Inicialmente foi obtido o ‘peso acumulado na PCA’ referente a soma dos pesos de cada variável da qualidade nas duas componentes principais (PC1 e PC2) determinadas pela geração da PCA. Neste caso, para certa formulação, valores do ‘peso acumulado’ acima de zero indicam que todas as variáveis da qualidade são maiores que o CONTROLE. Posteriormente, o ‘classificador multivariado’ foi calculado a partir da média aritmética do ‘RC médio’ com o ‘peso acumulado na PCA’ para certa formulação. Neste caso, para uma determinada combinação genética, toda formulação com valor de classificador acima de zero foi considerada significativamente efetiva em induzir calos ou aumentar a qualidade das mudas em comparação ao CONTROLE.

Adicionalmente, foram aplicados contrastes de médias para comparação das variáveis de qualidade e dos indicadores ‘RC’ e ‘C’. Para tanto, após a verificação da normalidade dos dados a partir de Kolmogorov-smirnov ($p < 0,05$), utilizou-se o teste não-paramétrico do Qui-quadrado ($p < 0,05$), seguido do teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes (para comparação de médias) e Q-Cochran de amostras relacionadas (para comparação de frequências). Os testes estatísticos foram realizados a partir do *software* R, pacotes *Agricolae* e *Kendall* (R Core Team, 2020). Para a análise multivariada foi utilizado o *software* ChemoStat (Helfer *et al.*, 2015).

5.3 Resultados

Seguindo a estratégia experimental, a apresentação dos resultados está estruturada dentro de cada ação das etapas de prospecção *in vitro* (etapa 1) e de validação *in vivo* (etapa 2).

Etapa 1.1. Seleção de compostos

No gráfico de escores gerado com sete compostos (DBA, AIA, AIB, BAP, FLO, HID e CIN) na dose referência (5 mg l^{-1}), em função das cinco variáveis da

qualidade, 99,21% da variância total dos dados foi explicada pelas componentes PC1 e PC2 (Fig.1A). A PC1 foi responsável pela separação dos compostos de interesse (89,43%). De forma geral, dois grupos independentes foram espacialmente constituídos, classificados conforme sua resposta em relação ao CONTROLE (tamanho do efeito). O grupo de baixo efeito (negativos na PC1) foi menos associado às variáveis explicativas, sendo constituído pelas amostras tratadas com FLO, HID e CIN. Já DBA, AIA, AIB e BAP constituíram o grupo de alto efeito, mantendo-se positivos à PC1 e associados às cinco variáveis explicativas. Em detalhe, para estes compostos, as variáveis 'massa', 'fusão' e 'crescimento do enxerto' foram mais influenciadas por DBA, AIB e BAP, enquanto a 'cor' e 'crescimento do porta-enxerto' foram mais influenciadas por AIA. Portanto, estes quatro compostos foram então considerados aptos à continuidade na etapa 1.2.

Etapa 1.2. Otimização de doses para os compostos selecionados

Os quatro compostos promissores em calogênese (DBA, AIA, AIB e BAP) foram novamente testados para diferentes doses (variando de 0,25 a 20 mg l⁻¹), conforme definido pelo delineamento de Doehlert, obtendo-se um gráfico PCA com as cinco variáveis da qualidade (Fig.1B). A variância total dos resultados (71,03%) foi explicada pela PC1 e PC3, sendo que PC1 respondeu pela maior separação dos tratamentos (58,87%). De forma geral, três grupos independentes foram espacialmente constituídos, classificados conforme sua resposta ao CONTROLE: grupo de baixo efeito (escores negativos na PC1), médio efeito (escores intermediários e positivos na PC1) e alto efeito (escores positivos e mais elevados na PC1).

No grupo de alto efeito, se destacaram as doses consideradas aptas à continuidade na etapa 1.3, sendo denominadas otimizadas (em mg l⁻¹) 1,00 para AIB e BAP, 1,75 para DBA e 2,50 para AIA. Em detalhe, a PC3 separou as formulações com doses otimizadas entre si. BAP(1,00) e AIB(1,00) se mantiveram positivos nesta componente, sendo diretamente associados às variáveis 'massa', 'fusão' e 'cor'. Já AIA(2,5) e DBA(1,75) se mantiveram mais associados às variáveis 'crescimento do enxerto' e 'porta-enxerto'.

Os grupos de baixo e médio efeito foram desconsiderados para continuidade na etapa 1.3. No grupo de médio efeito ocorreram as doses que induziram fusão de forma moderada, sendo (em mg l⁻¹): DBA(2,5; 5,00; 10,00); AIA(1,00; 2,00; 5,00); AIB(5,00) e BAP(0,25). No grupo de baixo efeito ocorreram as doses limitantes para

indução da fusão de calos ou fitotóxicas que levaram à sua inibição, sendo (em mg l⁻¹): DBA(0,25; 0,63; 1,00; 2,00; 7,50; 15,00; 20,00); AIA(0,25; 3,00; 7,50; 8,75; 10,00; 15,00; 20,00); AIB(0,25; 0,63; 1,75; 2,50; 10,00; 15,00; 20,00); BAP(0,63; 1,50; 1,75; 2,00; 2,50; 5,00; 10,00; 20,00).

Etapa 1.3. Definição das formulações candidatas

Na identificação das formulações mais ajustadas a cada combinação genética, foi aplicado o indicador de qualidade dos calos co-cultivados (RC_{invitro}) associado ao indicador 'peso acumulado' (Fig.2A). De forma geral, três grupos foram espacialmente constituídos, classificados conforme sua resposta relativa ao CONTROLE: os grupos de baixa e moderada resposta, apresentaram RC_{invitro} inferior ao CONTROLE (valores negativos no eixo y) e/ou não influenciaram positivamente as variáveis explicativas (valores negativos no eixo x). Estas formulações foram desconsideradas como candidatas. O grupo de alta resposta, apresentou RC_{invitro} superior ao CONTROLE (valores positivos no eixo y) e influenciou positivamente todas variáveis explicativas (valores positivos no eixo x). Neste caso, destacaram-se as seguintes: AIA(2,50)+BAP(1,00) para 'Bordô'/'P1103', 'Bordô'/'SO4', 'Bordô'/'VR043-43' e 'Riesling'/'SO4'; BAP(1,00) para 'Bordô'/'VR043-43'; DBA(1,75)+BAP(1,00) para 'Riesling'/'P1103' e 'Riesling'/'SO4'; AIB para 'Riesling'/'VR043-43'. Por este resultado, algumas combinações genéticas tiveram seus calos induzidos por mais de uma formulação, exigindo o refinamento destas formulações através da aplicação do indicador 'classificador multivariado'.

Os valores positivos do classificador resultaram naquelas formulações de alta capacidade de indução do co-cultivo dos calos (candidatas) (Fig.3A). Na média das seis combinações genéticas, foram destacadas as formulações AIA(1,75)+BAP(1,00) e DBA(1,75)+BAP(1,00). Ao isolar as cultivares, AIA(1,75)+BAP(1,00) apresentou o maior valor do classificador para 'Bordô', 'P1103' e 'SO4', mas superado por DBA(1,75)+BAP(1,00) em 'Riesling'. Da mesma forma, a formulação BAP (1,00), na média dos enxertos combinados ao 'VR043-43', também foi considerada candidata, por apresentar valor positivo maior que AIA(1,75)+BAP(1,00) e seguida por DBA(1,75)+BAP(1,00).

Portanto, na validação *in vivo* (etapa 2.1), optou-se por utilizar como formulações candidatas: DBA(1,75)+BAP(1,00) (nas seis combinações genéticas); AIA(1,75)+BAP(1,00) (em 'P1103' e 'SO4') e BAP(1,00) (em 'VR043-43'). A fusão

dos calos proporcionados por estas formulações está ilustrada na Fig.4A. De modo geral, observa-se elevada taxa de crescimento e grau de fusão nos co-cultivos induzidos em comparação ao CONTROLE. Porém, entre as formulações, DBA(1,75)+BAP(1,00) proporcionou calos com menor tonalidade branca indicando certa oxidação, o que contrasta com a coloração branca dos calos obtidos por AIA(1,75)+BAP(1,00) e BAP(1,00). Este efeito corrobora ao verificado na etapa 1.1 (Fig.1A) e 1.2 (Fig.1B), quando o composto DBA se manteve em quadrante oposto à variável cor, indicando efeito negativo deste composto em comparação às demais formulações (Fig.3A).

De forma complementar e apenas para a combinação 'Riesling'/'SO4', as sete formulações contrastadas nesta etapa (isoladas e em mistura) foram mantidas e validadas na etapa 2.1.

Etapa 2.1. Obtenção das formulações promissoras in vivo

As formulações mais ajustadas a cada combinação genética foram identificadas a partir da associação do indicador de qualidade de mudas ($RC_{in vivo}$) com o indicador 'peso acumulado' (Fig.2B). Novamente, três grupos foram espacialmente constituídos, porém, diferente da etapa 1.3, a associação dos indicadores para cada combinação E/PE, distribuíram-se entre os grupos de média e alta resposta. No grupo de alta resposta, destacaram-se as formulações: PADRÃO para 'Bordô'/'P1103', 'Bordô'/'SO4', 'Bordô'/'VR043-43' e 'Riesling'/'SO4'; AIA(2,50)+BAP(1,00) para 'Bordô'/'SO4' e 'Riesling'/'SO4'; AIB(1,00) e DBA(1,75)+BAP(1,00) para 'Riesling'/'SO4'. Já no grupo de média resposta, destacaram-se: PADRÃO para 'Riesling'/'VR043-43' e 'Riesling'/'P1103'; AIA(2,50)+BAP(1,00) para 'Bordô'/'P1103' e 'Riesling'/'P1103'. Por este resultado, naquelas combinações genéticas afetadas por diferentes formulações no mesmo grupo de resposta, aplicou-se o classificador multivariado para a definição das formulações promissoras (Fig. 3B). Na média das seis combinações genéticas, as formulações PADRÃO e AIA(2,50)+BAP(1,00) foram similares no valor do classificador. Esse mesmo resultado também foi mantido quando isolado por genótipo. Já para 'VR043-43', em que BAP(1,00) e DBA(1,75)+BAP(1,00) foram utilizados como formulações candidatas, apenas a PADRÃO se destacou. Especificamente, na análise do desempenho das sete formulações, envolvendo apenas a combinação 'Riesling'/'SO4', apenas as formulações contendo AIB não repetiram o comportamento verificado na etapa 1.3. Enquanto que a formulação

isolada AIB(1,0) favoreceu a qualidade da muda com valor similar ao PADRÃO, AIB(1,00)+BAP(1,00) teve efeito antagônico, desfavorecendo a qualidade da muda. Novamente, as formulações AIA(2,50)+BAP(1,00) e DBA(1,75)+BAP(1,00) confirmaram-se como potenciais promissoras, com valores de classificador similares ao PADRÃO.

O detalhamento sobre quais variáveis da qualidade as formulações confirmaram-se ou não como promissoras, foi realizado no conjunto das seis combinações E/PE (Tab.1). Nas variáveis relacionadas à brotação (Tab.1A) o percentual foi 100% no CONTROLE dos enxertos em 'P1103'. Contudo, em 'Riesling'/'P1103' as brotações declinaram sob efeito das formulações e, em 'Bordô'/'P1103', houve insensibilidade aos tratamentos. Para 'SO4' e 'VR043-43', as brotações no CONTROLE não atingiram 90%, tanto em 'Riesling' quanto em 'Bordô'. Nestas combinações genéticas, as diferenças verificadas pelo uso das formulações não foram suficientes para promover contrastes significativos. Quanto às diferenças entre cultivares, de modo geral, 'Riesling'/'VR043-43' apresentou os menores valores em comparação às demais combinações genéticas, que se mantiveram similares entre si. Quanto ao estágio fenológico dos brotos (Tab.1B), sob aplicação das formulações, os enxertos em 'VR043-43' foram insensíveis e 'Riesling'/'P1103' foi negativamente afetada. Nas demais combinações genéticas, o efeito das formulações foi positivo em comparação ao CONTROLE. Dentre as formulações, em 'Bordô'/'P1103', AIA(2,50)+BAP(1,00) apresentou ganhos superiores em comparação a PADRÃO. Já em 'Bordô'/'SO4', AIA(2,50)+BAP(1,00) e PADRÃO apresentaram desempenho similar entre si. Nos enxertos em 'VR043-43', o estágio foi menor que os observados em 'SO4' e 'P1103', independentemente dos tratamentos aplicados.

Nas variáveis relacionadas à qualidade da calogênese, o percentual de plantas com calo de enxertia (Tab.1C) superou os 90% no CONTROLE, com exceção de 'Bordô'/'SO4' e nos enxertos em 'VR043-43'. Dentre as formulações, nos enxertos em 'P1103' e 'SO4', AIA(2,50)+BAP(1,00) apresentou ganhos similares à PADRÃO. Já nos enxertos em 'VR043-43', apenas PADRÃO apresentou efeito positivo em comparação ao CONTROLE, mas, mesmo assim, muito abaixo ao verificado nos enxertos em 'SO4' e 'P1103' na PADRÃO. Quanto a taxa de formação de calos (Tab.1D) e diâmetro de calo (Tab.1E), ocorreu o mesmo comportamento das combinações genéticas aos tratamentos. Na Fig.4B é ilustrado o aspecto geral da calogênese da enxertia em três níveis de taxas de

formação (alta, moderada e baixa). Considerando o CONTROLE, as maiores diferenças se deram em função do porta-enxerto. Nos enxertos em 'SO4' os calos foram menos formados e com menor diâmetro, quando comparados aos enxertos em 'P1103'. Quanto às diferenças entre enxertos, os calos menos formados e de menor diâmetro ocorreram em 'Bordô'. Nos contrastes entre formulações, à exceção dos enxertos em 'VR043-43', que se mantiveram similares ao CONTROLE, as demais combinações genéticas responderam positivamente aos tratamentos. De modo geral, em 'Riesling'/'P1103' e 'Riesling'/'SO4' os valores das duas variáveis para PADRÃO e AIA(2,50)+BAP(1,00) foram altos e similares entre si. Já para 'Bordô'/'P1103' e 'Bordô'/'SO4', houve vantagem para a PADRÃO, especialmente no diâmetro de calos.

No percentual de plantas com raízes (Tab.1F) o CONTROLE foi influenciado pela combinação genética, de modo que, naquelas com 'P1103' os valores foram maiores que em 'SO4'. Porém, apenas nos enxertos em 'P1103', os valores foram superiores a 90%. Nos enxertos em 'VR043-43' não houve indução radicial em nenhum tratamento. Quanto ao efeito das formulações, apenas em 'Bordô'/'P1103' o percentual de enraizamento foi similar entre elas. Nas demais combinações genéticas, foi a PADRÃO que se destacou com os maiores valores.

Com base nos resultados expostos na Tab.1, de modo geral, destacou-se AIA(2,50)+BAP(1,00) com desempenho similar a PADRÃO na maior parte dos indicadores, em detrimento à DBA(1,75)+BAP(1,00). Nos enxertos em 'VR043-43', tanto BAP(1,00) quanto PADRÃO não induziram variáveis de qualidade satisfatórias. Porém, o resultado mais relevante recai no efeito significativo da combinação genética sobre as variáveis da qualidade, refletido no cálculo do indicador 'C' (Tab.1G). Por este indicador, houve a tendência da qualidade das mudas diminuir conforme a seguinte ordem de combinação genética: 'Riesling'/'P1103' (0,90), 'Bordô'/'P1103' (0,81), 'Riesling'/'SO4' (0,66) e 'Riesling'/'P1103' (0,44). Já nos enxertos sobre 'VR043-43' ocorreram os menores e similares valores entre si (0,20). Destaca-se que, na condição *in vitro*, para o $C_{in vitro}$ (Fig.4) não se observou este tipo de resposta, de modo que, indiferente da combinação genética, manteve-se constante e baixo (0,33). Portanto, a expressão da qualidade original do material vegetal *in vivo* e *in vitro*, constituinte das combinações genéticas, diferenciou-se entre si. Esta diferença influenciou no grau de resposta da qualidade dos calos ($RC_{in vitro}$) e das mudas ($RC_{in vivo}$) em relação às formulações testadas. Assim, os valores $C_{in vitro}$ e $C_{in vivo}$ foram analisados

juntamente ao RC_{invitro} e RC_{invivo} , respectivamente, conforme descrito a seguir (Fig.5).

O RC_{invitro} foi positivo nas seis combinações genéticas para as três formulações candidatas (Fig.5A). O RC_{invitro} de cada formulação, apresentou a tendência de ser influenciado pelas combinações genéticas de forma similar. Na cultivar 'Riesling' tanto em 'P1103' quanto em 'SO4' ocorreram os menores valores de RC_{invitro} . Por outro lado, 'Bordô' em 'P1103' e 'SO4', apresentaram os maiores. Neste caso, ocorreram diferenças entre formulações, de modo que, AIA(2,50)+BAP(1,00) se destacou, apresentando maior valor. Em 'VR043-43', diferenças entre formulações ocorreram para 'Riesling' com vantagem para BAP(1,00) em comparação a DBA(1,75)+BAP(1,00). Já para 'Bordô' o RC_{invitro} se manteve similar entre as formulações. Quanto ao C_{invitro} , diferente do RC_{invitro} , se manteve constante entre as combinações genéticas (Fig.5A). Assim, não foi possível obter nenhuma relação entre estes os dois indicadores.

No caso do RC_{invivo} (Fig.5B), as três formulações candidatas mais a PADRÃO foram consideradas nesta análise. Inicialmente, à exceção de BAP(1,00), as demais formulações afetaram na mesma intensidade a combinação genética. 'Riesling'/'P1103' foi a menos beneficiada pelas formulações com valores negativos de RC_{invivo} (inferiores ao CONTROLE) e semelhantes entre si. Posteriormente, 'Bordô'/'P1103' e 'Riesling'/'SO4' resultaram em valores positivos de RC_{invivo} . Já 'Bordô'/'SO4' foi a mais beneficiada pelas formulações, com maior RC_{invivo} em relação ao CONTROLE. Destaca-se que foi em Bordô'/'SO4' que ocorreram diferenças entre formulações, em que a PADRÃO se destacou com o maior RC_{invivo} , seguido por AIA(2,50)+BAP(1,00). O RC_{invivo} foi nulo e baixo na média das três formulações em 'VR043-43'.

Finalmente, buscando-se uma relação entre RC_{invitro} e RC_{invivo} na formulação AIA(2,50)+BAP(1,00), aplicada nos enxertos em 'P1103' e 'SO4', ocorreu variação similar entre estes indicadores (Fig.5C). Neste caso, para o mesmo porta-enxerto, tanto o RC_{invitro} como RC_{invivo} apresentaram os maiores valores em 'Bordô'. Porém, enquanto que o RC_{invivo} variou em intensidade de acordo com a combinação genética (entre -1 e +1), RC_{invitro} manteve valores similares entre os enxertos (acima de zero). Além disso, um valor referência de RC_{invitro} foi determinado (0,5), a partir do qual indicou altos valores de RC_{invivo} independente da combinação genética. Ou seja, tanto em 'P1103' quanto 'SO4', 'Bordô' apresentou RC_{invitro} maior que 0,5, retornando o maior RC_{invivo} de 0,14 e 0,44, respectivamente. No caso de 'Riesling',

o RC_{invitro} foi inferior a 0,5, retornando em 'P1103' e 'SO4' -0,38 e 0,25, respectivamente. Quanto aos enxertos em 'VR043-43', na formulação BAP(1,00), mesmo tendo nos dois enxertos valores de RC_{invitro} superiores a 0,5, os valores de RC_{invivo} variaram em função da cultivar enxertada, destacando-se 'Bordô'.

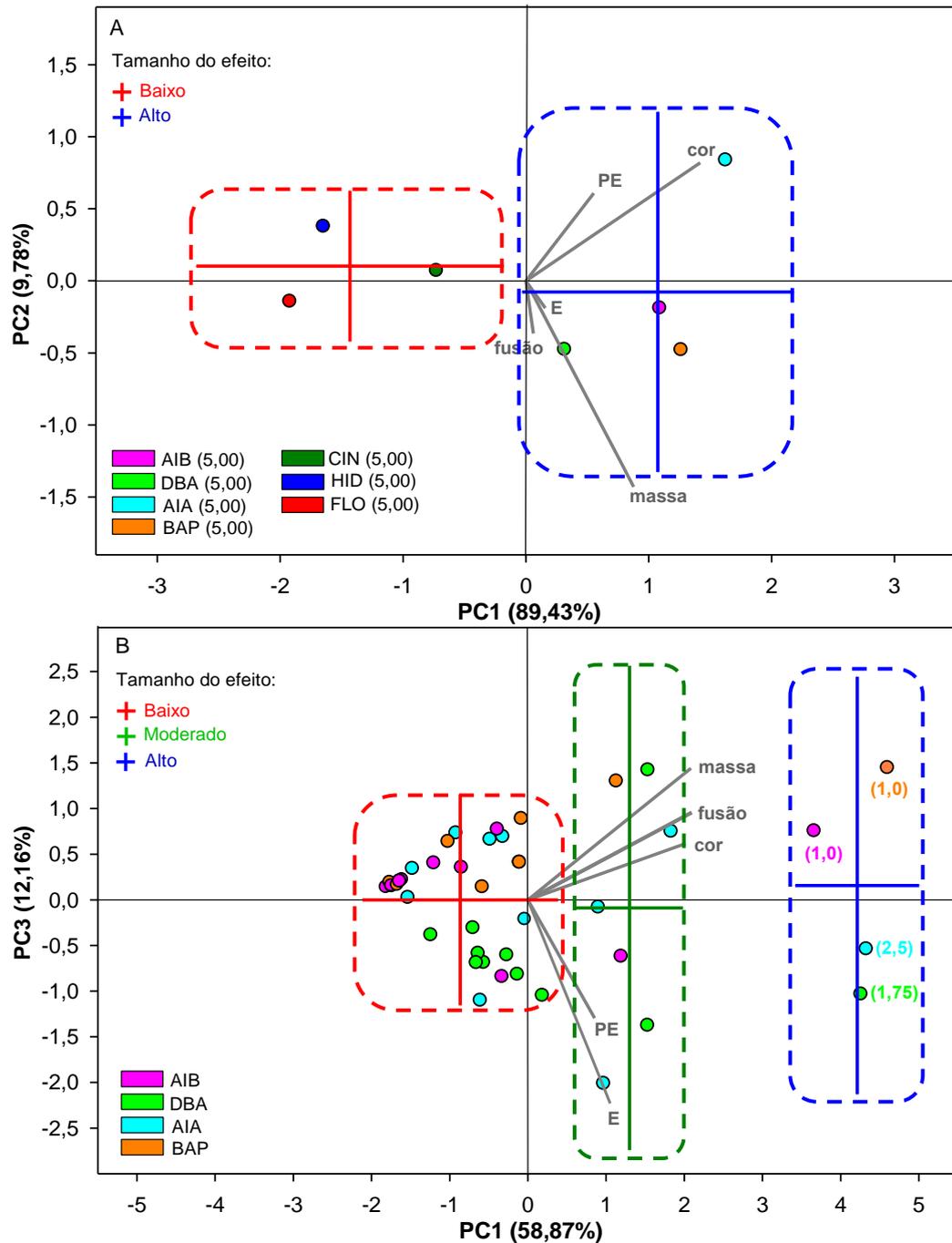


FIGURA 1. Análise de componentes principais (PCA) realizada com o RC_{invitro} das variáveis da qualidade: crescimento do enxerto (E) e do porta-enxerto (PE), percentual sem oxidação (cor), grau de fusão (fusão) e massa de calos (massa) co-cultivados de 'Riesling'/'SO4'. Nesta etapa (1.1), os calos foram mantidos sem aplicação (CONTROLE) ou tratados com AIB (ácido indolbutírico), AIA (ácido indolacético), DBA (ácido 2,5 diclorobenzóico), BAP (6-benzilaminopurina), CIN (cinetina), HID (hidroquinona) e FLO (floroglucinol), na dose referência (5,00 mg l⁻¹) (A). A partir dos compostos selecionados (quadrado azul em A), realizou-se nova PCA (B) com as mesmas variáveis da qualidade, considerando como tratamentos doses variando de 0,25 a 20 mg l⁻¹ (B). As doses otimizadas selecionadas estão no quadrado azul em B (em mg l⁻¹). Barras múltiplas de desvio padrão ($\pm 2\sigma$) não sobrepostas indicam discriminação amostral entre grupos com distintos tamanhos de efeito.

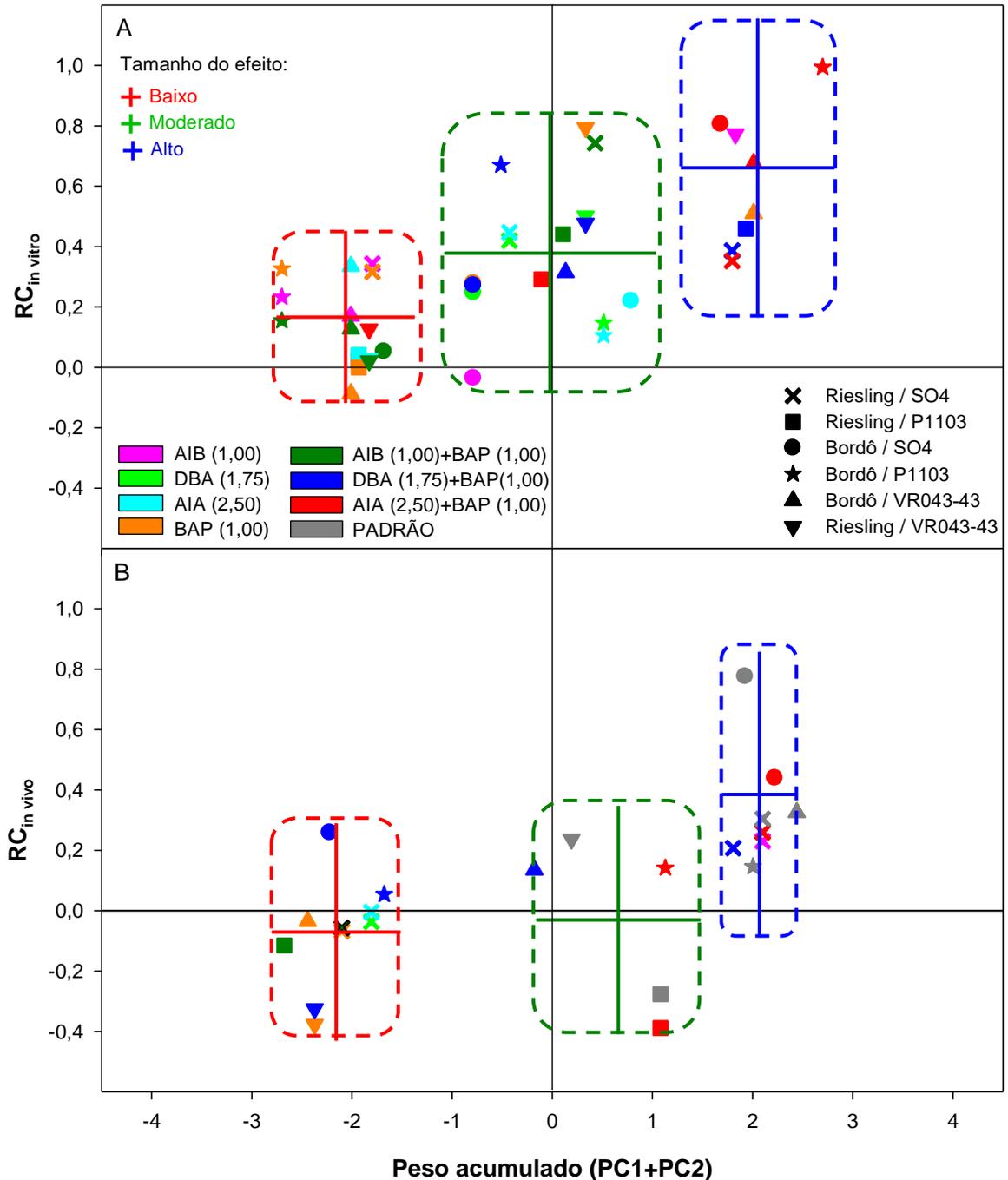


FIGURA 2. Variação do indicador da qualidade da fusão de calos co-cultivados ($RC_{in vitro}$) (A) e da qualidade de mudas enxertadas ($RC_{in vivo}$) (B) em função da variação do indicador 'peso acumulado' da PC1+PC2 na PCA, para sete formulações de reguladores de crescimento (doses em $mg\ l^{-1}$) (descrição das siglas na legenda da Fig.01) e mais a formulação PADRÃO (cera com DBA) (apenas em B), nas seguintes combinações enxerto/porta-enxerto: 'Riesling Itálico' e 'Bordô' em: 'SO4', 'P1103' e 'VR043-43'. Barras múltiplas de desvio padrão ($\pm 2\sigma$) não sobrepostas indicam discriminação amostral entre grupos com distintos tamanhos de efeito. Quanto maior o valor do 'RC' e do 'peso acumulado' maior a capacidade da formulação em aumentar a qualidade de calos cofusionados e mudas enxertadas em relação ao CONTROLE.

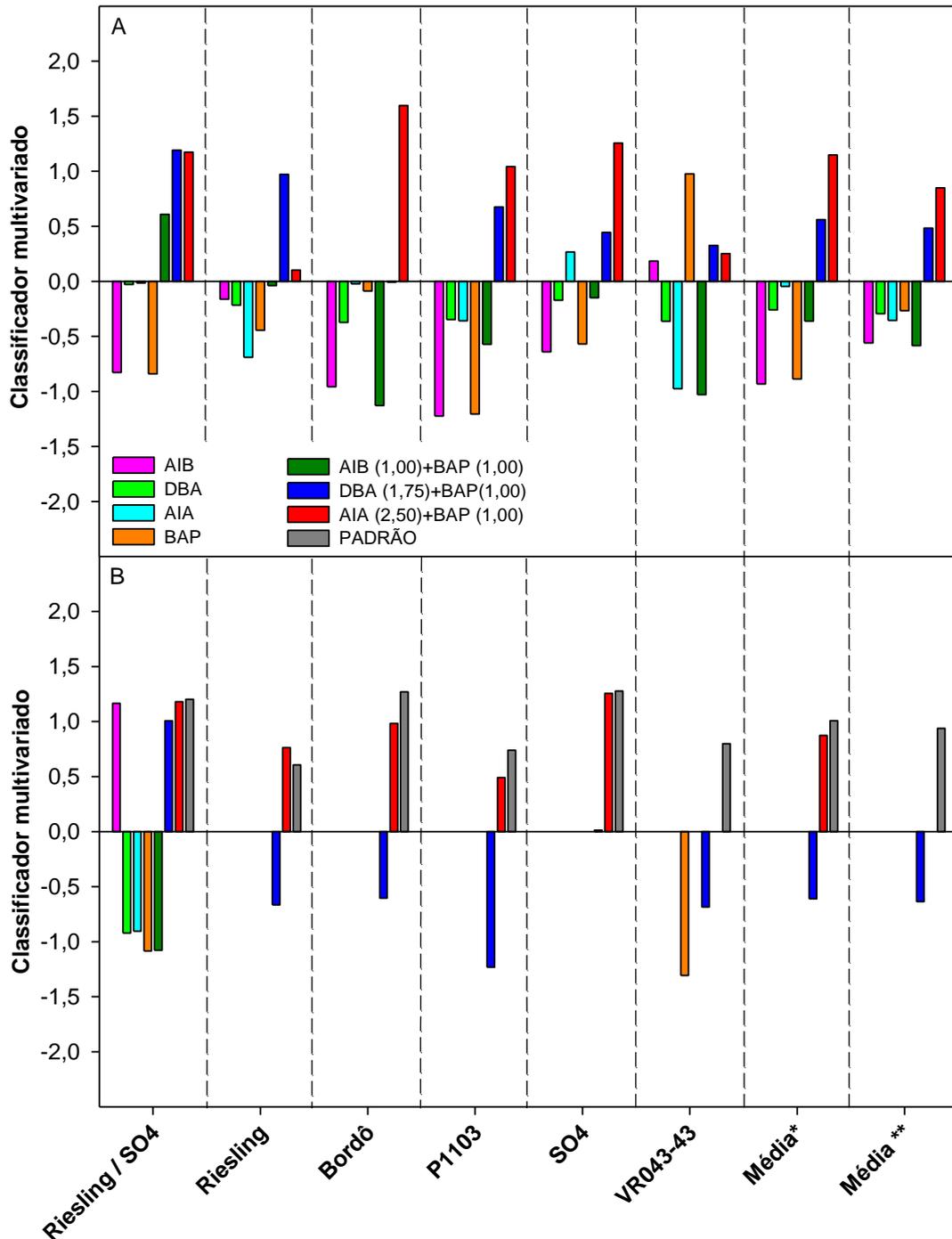


FIGURA 3. Classificação das formulações nas etapas finais da prospecção *in vitro* (A) (etapa 1.3) e da validação *in vivo* (B) (etapa 2.1) para obtenção, respectivamente, de formulações candidatas e promissoras, dentre sete formulações de reguladores de crescimento (doses em mg l^{-1}) (descrição das siglas na legenda da Fig.01) e mais a formulação PADRÃO (cera com DBA) (apenas em B), nas seguintes combinações E/PE: 'Riesling Itália' e 'Bordô' em: 'SO4', 'P1103' e 'VR043-43'. Média entre classificadores nas cultivares enxertadas em 'SO4' mais 'P1103' (*) e para as seis combinações (**). O classificador foi obtido a partir da média aritmética entre os indicadores 'RC' e 'peso acumulado' (extraídos a partir na Fig.2). Formulações com valores positivos no eixo x destacam-se por maior resposta da qualidade de calos fusionados e mudas enxertadas em relação ao CONTROLE.

A. Cocultivo de calos <i>in vitro</i>						
TRAT.	P1103		SO4		VR43-43	
	Riesling	Bordô	Riesling	Bordô	Riesling	Bordô
BAP	---	---	---	---		
AIA+BAP					---	---
DBA+BAP						
CONTROLE						
C_{invitro}	0,37±0,2 ^{NS}	0,39±0,2	0,28±0,1	0,38±0,2	0,25±0,1	0,31±0,1

B. Calogênese na enxertia <i>in vivo</i>					
Alta		Moderada		Baixa	
Frontal	Lateral	Frontal	Lateral	Frontal	Lateral

FIGURA 4. Aspecto de calos, após 30 dias de co-cultivo pelos tratamentos que representam os enxertos ('Riesling' e 'Bordô') combinados aos porta-enxertos ('VR043-43', 'P1103' e 'SO4') sob efeito das formulações candidatas (doses em mg l⁻¹) (A): BAP(1,0), AIA(2,5)+BAP(1,0), DBA(1,75)+BAP(1,0) e com o tratamento CONTROLE (sem aplicação de formulação). Linha vertical amarela e horizontal preta: exemplifica a região em que ocorreu a fusão entre enxerto - E e porta-enxerto - PE. (^{NS}) Médias (±desvio padrão) seguidas de mesma letra não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05). (---) Tratamento não aplicado. *C_{invitro}*: quanto mais acima de zero e próximo ao valor 1,00, maior a qualidade dos calos cofusionados na condição CONTROLE. Calos fusionados *in vitro*, com coloração amarelo-pardo são indicativos de danos por oxidação dos tecidos. Calos de enxertia *in vivo*, na sua dimensão frontal e lateral, após 30 de forçagem, em três taxas de formação (conforme escala proposta por Celik, 2000): alta (entre 75 e 100%), moderada (entre 75 e 25%) e baixa (abaixo de 25%) (B).

TABELA 1. Variáveis da qualidade de mudas, obtidas nas seis combinações dos enxertos 'Riesling Itália' e 'Bordô' sobre os porta-enxertos, 'P1103', 'SO4' e 'VR043-43', tratados com as formulações de reguladores de crescimento (doses em mg l⁻¹) (TRAT.) (descrição das siglas na legenda da Fig.1): BAP(1,00), AIA(2,50)+BAP(1,00), DBA(1,75)+BAP(1,00), PADRÃO (cera com DBA) e CONTROLE (sem aplicação de formulação).

TRAT.	P1103		SO4		VR43-43	
	Riesling	Bordô	Riesling	Bordô	Riesling	Bordô
A - Plantas com brotação (%)						
BAP	---	---	---	---	54 ^{Bns}	100 ^{nsA}
AIA+BAP	75 ^{Bb}	94 ^{Ans}	96 ^{Ans}	92 ^{Ans}	---	---
DBA+BAP	84 ^{Aa}	94 ^A	91 ^A	96 ^A	59 ^B	87 ^A
PADRÃO	80 ^{Bb}	100 ^A	93 ^A	97 ^A	58 ^C	90 ^A
CONTROLE	100 ^{Aa}	100 ^A	84 ^B	79 ^B	73 ^B	91 ^A
B - Estádio fenológico de brotos (Nota)						
BAP	---	---	---	---	2,2±1,2 ^{Bns}	3,4±0,7 ^{Ans}
AIA+BAP	5,5±4,3 ^{Bb}	8,8±2,7 ^{Aa}	7,3±2,0 ^{Aa}	4,5±1,9 ^{Ba}	---	---
DBA+BAP	4,6±2,9 ^{Bb}	7,8±2,3 ^{Aab}	6,5±3,1 ^{Aab}	4,0±2,0 ^{Bab}	2,0±1,0 ^C	3,0±0,9 ^C
PADRÃO	5,1±3,4 ^{Ab}	6,0±2,6 ^{Ab}	6,4±2,5 ^{Aab}	5,1±2,2 ^{Aa}	2,4±1,7 ^C	3,0±1,2 ^C
CONTROLE	8,0±2,6 ^{Aa}	5,4±2,1 ^{Bb}	5,5±2,6 ^{Bb}	3,3±1,7 ^{Cb}	2,5±1,0 ^C	3,0±0,8 ^C
C - Plantas com calo de enxertia (%)						
BAP	---	---	---	---	0 ^{NSb}	0 ^b
AIA+BAP	100 ^{NSa}	100 ^{ns}	100 ^a	100 ^a	---	---
DBA+BAP	76 ^{ABb}	100 ^A	82 ^{ABb}	64 ^{Bb}	0 ^{bC}	0 ^{bC}
PADRÃO	100 ^{Aa}	100 ^A	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	25 ^{aB}	23 ^{aB}
CONTROLE	100 ^{Aa}	100 ^A	96 ^{Aa}	64 ^{Bb}	5 ^{Bc}	0 ^{bC}
D - Taxa de formação do calo de enxertia (%)						
BAP	---	---	---	---	0 ^{NSns}	0 ^{ns}
AIA+BAP	95±16 ^{Aa}	89±20 ^{Aa}	97±8 ^{Aa}	68±30 ^{Bb}	---	---
DBA+BAP	46±27 ^{NSb}	73±22 ^b	68±27 ^b	63±24 ^b	0	0
PADRÃO	94±17 ^{Aa}	96±12 ^{Aa}	100±2 ^{Aa}	93±14 ^{Aa}	10±7 ^B	21±10 ^B
CONTROLE	85±18 ^{Aa}	66±23 ^{Bb}	51±33 ^{Bb}	46±32 ^{Bc}	6±1 ^C	0
E - Diâmetro médio do calo de enxertia (mm)						
BAP	---	---	---	---	0 ^{NSc}	0 ^{ns}
AIA+BAP	4,9±1,3 ^{Aab}	3,5±1,4 ^{Bb}	4,8±1,2 ^{Aa}	3,0±1,3 ^{Bab}	---	---
DBA+BAP	2,0±1,4 ^{NSb}	3,3±1,2 ^b	2,3±1,6 ^b	1,7±0,9 ^b	0 ^c	0
PADRÃO	6,0±1,7 ^{Aa}	5,8±1,3 ^{Aa}	5,2±1,0 ^{Aa}	5,4±1,4 ^{Aa}	0,9±1,4 ^{Ba}	0,1±0,1 ^B
CONTROLE	4,2±1,5 ^{Aab}	3,6±1,4 ^{ABb}	2,4±1,5 ^{BC b}	0,9±1,1 ^{Cb}	0,1±0,1 ^{Cb}	0
F - Plantas com raízes (%)						
BAP	---	---	---	---	0 ^{NSns}	0 ^{ns}
AIA+BAP	69 ^{Bb}	94 ^{Ans}	8 ^{Cc}	42 ^{Cb}	---	---
DBA+BAP	44 ^{Bc}	94 ^A	91 ^{Aa}	20 ^{BCb}	0 ^C	0 ^C
PADRÃO	92 ^{Aa}	100 ^A	52 ^{Bb}	86 ^{Aba}	0 ^C	0 ^C
CONTROLE	96 ^{Aa}	100 ^A	60 ^{Bb}	25 ^{BCb}	0 ^C	0 ^C
G - CONTROLE MÉDIO NORMALIZADO (C_{in vivo})						
C _{in vivo}	0,90±0,1 ^A	0,81±0,2 ^{AB}	0,66±0,2 ^{BC}	0,44±0,2 ^C	0,18±0,3 ^C	0,21±0,4 ^C

Médias (±desvio padrão) seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05). (NS/ns) não-significativo. (---) Tratamento não aplicado. C_{in vivo}: quanto mais acima de zero e próximo ao valor 1,00, maior a qualidade das mudas enxertadas na condição CONTROLE.

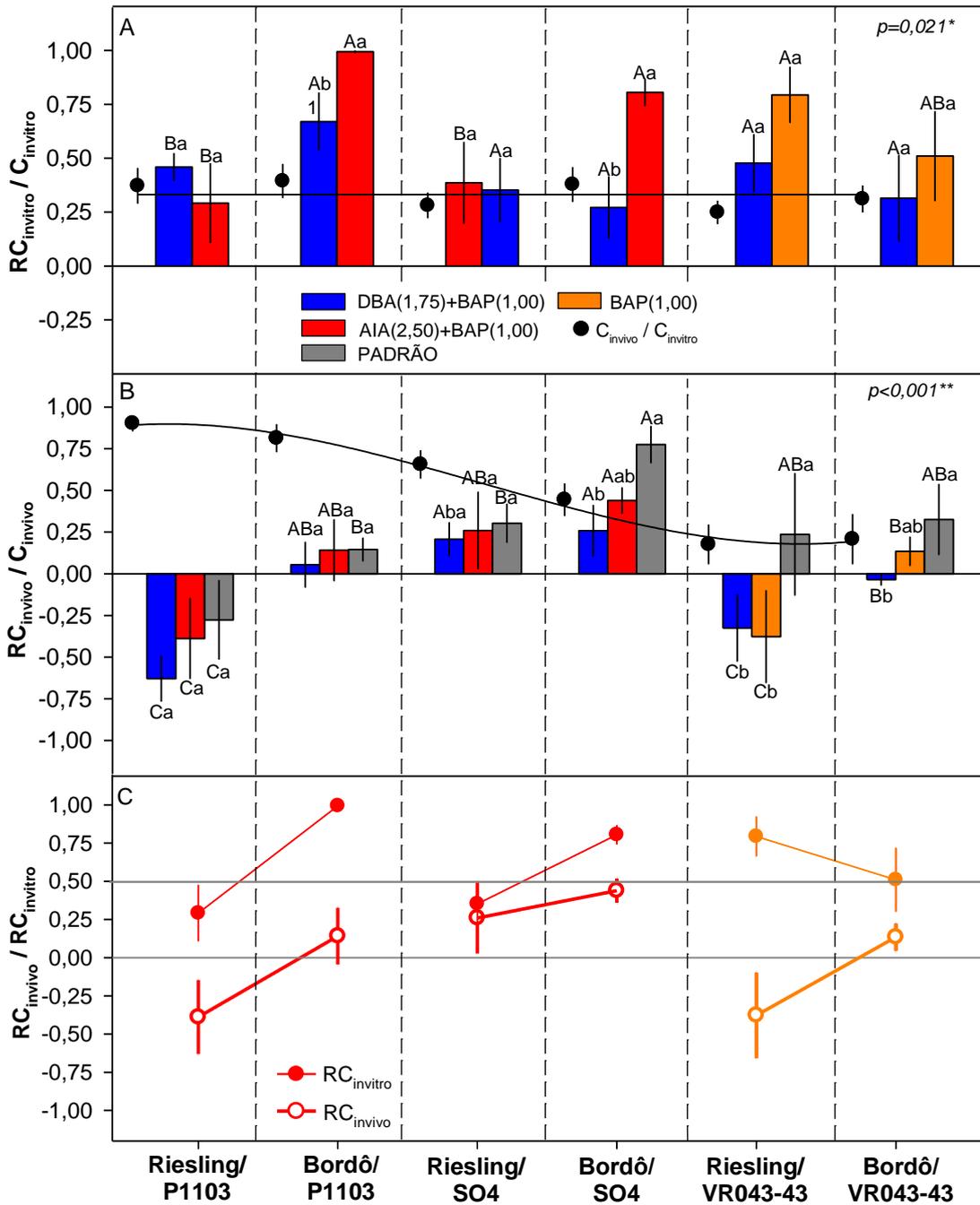


FIGURA 5. Variação dos indicadores da qualidade dos calos cofusionados ($RC_{invitro}$ e $C_{invitro}$) (A) e das mudas ($RC_{in vivo}$ e $C_{in vivo}$) (B) para três formulações de reguladores de crescimento (doses em $mg\ l^{-1}$) (descrição das siglas na legenda da Fig.01) mais a formulação PADRÃO (cera com DBA) (apenas em B), nas seguintes combinações E/PE: ‘Riesling Itálico’ e ‘Bordô’ em: ‘SO4’, ‘P1103’ e ‘VR043-43’. Na formulação AIA(2,5)+BAP(1,0) para os enxertos em ‘SO4’, ‘P1103’ e BAP(1,00) em ‘VR043-43’, detalha-se a resposta de $RC_{in vivo}$ e $RC_{invitro}$ entre cultivares enxertadas para o mesmo porta-enxerto (C). Em A e B, barras sobrepostas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula entre combinações e minúscula entre formulações, pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). ¹Erro padrão da média. Os indicadores $C_{invitro}$ (A) e $C_{in vivo}$ (B) representam a variação do tratamento CONTROLE entre combinações (extraídos da Fig.4A e Tab. 1G, respectivamente).

5.4 Discussão

A estratégia de prospecção *in vitro* e validação *in vivo* se mostrou efetiva para seleção de formulações de reguladores de crescimento com potencial de indução de calogênese na enxertia da videira. Em *Vitis* spp. trabalho associando o desenvolvimento de mudas *in vitro* com o seu vigor *in vivo* foi realizado por Aazami (2010). Ou seja, apesar da disponibilidade de protocolos de cultivo de calos em videiras, não há referencial quanto à relação do co-cultivo de calos *in vitro* com a calogênese que ocorre na cicatrização de enxertia *in vivo*. Como resultado desta estratégia, das diferentes combinações que foram prospectadas e validadas, a formulação AIA(2,50)+BAP(1,00) se apresentou como a promissora. Cabe destacar preliminarmente, que ao longo das etapas *in vitro* também se estabeleceu um conjunto de formulações efetivas para indução da fusão de calos. Esta informação torna-se relevante, pois não existem referências para o co-cultivo de calos de videira; somente para outras espécies, como *Citrus* (Jonard *et al.*, 1990) e *Prunus* (Errea *et al.*, 2001).

Na etapa de seleção de compostos (1.1), destacou-se o DBA, AIA, AIB e BAP na indução da fusão dos calos (Fig.1A). Considerando-se as referências para formação de calos isolados em *Vitis* spp., confirmaram-se os benefícios propiciados por estes compostos (Mii *et al.*, 1991; Khan *et al.*, 2015; Kumsa, 2017). Em calos, tanto auxinas como citocininas desencadeiam a proliferação celular, quando em doses ótimas (Jaskani *et al.*, 2008). As auxinas são os principais compostos utilizados na formação da massa pró-embriogênica. Conforme Jiménez (2001), meios contendo auxinas levam a alterações na expressão gênica da massa celular, sendo a dose o fator que define a continuidade do crescimento globular ou diferenciação celular. Já as citocininas, promovem a síntese de RNA e proteínas em calos, aumentando a atividade enzimática relacionada à divisão celular e o afrouxamento da parede celular (Khan *et al.*, 2015).

Dentre os compostos não selecionados, a cinetina (CIN) foi a citocinina com resposta não efetiva (Fig.1A). Resultado semelhante foi obtido em videiras por Khan *et al.* (2015), que evidenciaram maior benefício do BAP em detrimento da CIN. Por outro lado, Mastuti *et al.* (2017), em *Physalis* spp., associaram CIN à AIA, obtendo elevadas taxas de formação de calos, apesar de serem menos compactos do que na associação de BAP à AIA. Da mesma forma, hidroquinona e floriglucinol não resultaram em efeitos positivos (Fig.1A). Conforme reportado por Hoque e

Arima (2002), em *Trapa* spp., estes compostos apresentaram efeito antioxidante na produção de calos, reduzindo o acúmulo de fenóis e favorecendo a ação das auxinas. Porém, este efeito aditivo só foi possível ao serem combinados ao 2,4D no meio de cultura. Ou seja, cinetina, hidroquinona e floroglucinol, podem ser viáveis ao co-cultivo de calos de videiras, dependendo da forma como são utilizados, como em misturas a outros compostos ou em doses mais otimizadas. Cabe ressaltar ainda que, dentre os compostos utilizados para os testes *in vitro* (FLO, HID, BAP, CIN, AIB, AIA e DBA), alguns reguladores de crescimento tradicionalmente utilizados em protocolos na cultura de tecidos não foram testados por não serem considerados adequados para uso *in vivo*. É o caso do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), que foi desconsiderado por ser um ácido forte e tóxico ao homem e ao ambiente (Opa Junior *et al.*, 2002). Por outro lado, testou-se o DBA, que apesar de não ser uma auxina tradicionalmente utilizada em trabalhos de cultivo de calos *in vitro*, é uma das mais utilizadas para indução da calogênese em mudas e está presente nas principais ceras comerciais de enxertia (Waite *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018).

Na otimização de doses (etapa 1.2), em se tratando de reguladores de crescimento, as respostas fisiológicas são tecido-específico (Aloni, 1980; Ender e Streider, 2015) de modo que, as doses otimizadas foram específicas para o co-cultivo de calos. As doses obtidas (em mg l⁻¹) para cada composto (variando de 1,00 a 2,50) (Fig.1B), de modo geral, se apresentam baixas, mas estão de acordo com outros autores na indução de calos isolados em cultivares de *Vitis* spp. (Mii *et al.*, 1991; Khan *et al.*; 2015; Kumsa, 2017). Conforme Can *et al.* (2014) altas concentrações de reguladores de crescimento em meios de cultivo inibem a divisão e as reações bioquímicas celulares, induzindo a morte de explantes.

Quanto à obtenção das formulações candidatas para validação *in vivo* (etapa 1.3), destacou-se AIA(2,50)+BAP(1,00) e DBA(1,75)+BAP(1,00) nas combinações genéticas com 'P1103' e 'SO4' em detrimento das formulações isoladas (Fig.2A e 5A). O efeito superior do uso associado de auxinas e citocininas em comparação às aplicações isoladas, corrobora ao verificado por Srngh e Brar (1993). Conforme esses autores, calos podem ser produzidos apenas por auxinas em videiras, mas apesar de elevada proliferação celular, apresentam-se friáveis, não permanecendo estáveis ao longo do tempo. Contudo, quando associados ao BAP, estimula-se a formação de calos compactos, pois esta citocinina favorece a lignificação através

da rota dos fenilpropanóides (Kaparakis e Alderson, 2003). Para que este efeito sinérgico ocorra, deve haver o equilíbrio entre as doses de ambos reguladores de crescimento. Normalmente, o BAP tem sido utilizado em proporção inferior à auxina (Khan *et al.*, 2015; Mastuti *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018). Elevadas concentrações de BAP em relação a auxinas induzem a diferenciação do calo e regeneração foliar (Khan *et al.*, 2015; Masuti *et al.*, 2017). Já nas combinações com 'VR043-43', foi BAP(1,00) quem se mostrou como a formulação candidata (Fig.2A e 5A). A utilização exclusiva de BAP na formação de calos isolados em certas cultivares de *Vitis* spp. já foi reportado por Khan *et al.* (2015). Este resultado confirma que as respostas dos calos em relação às formulações são também genótipo-específico (Jiménez e Bangerth, 2000) mesmo em se tratando de uma massa embriogênica não diferenciada.

Na validação *in vivo* das formulações candidatas (etapa 2.1) foram adotadas três premissas para que estas fossem consideradas promissoras. Em primeiro, deveriam ser eficientes não apenas para indução calogênese, mas também para brotação e enraizamento. Conforme Nanda e Melnyk (2018) a muda de videira só é considerada efetiva e funcional, quando os processos de brotação e de enraizamento ocorrem de modo integrado à calogênese. Em segundo, nas combinações E/PE responsivas à formulação deveria haver vantagem pelo seu uso em relação ao tratamento CONTROLE. Este (aplicado sem a utilização de reguladores de crescimento) indicou a capacidade natural de formação de mudas viáveis a partir do balanço hormonal endógeno das combinações E/PE, estimulado apenas pelas condições da produção das mudas. Em terceiro, quando resultado superior ao CONTROLE, deveriam apresentar no mínimo a equivalência de desempenho em comparação a formulação comercial PADRÃO. Mesmo que as formulações candidatas e PADRÃO tenham características físico-químicas distintas (misturas em água e cera parafínica, respectivamente), o resultado desta terceira premissa é que permite justificar uso comercial da formulação promissora.

Quanto à primeira premissa, a mistura entre auxinas e citocininas determinou a melhoria da qualidade das mudas enxertadas em 'SO4' e 'P1103'. De modo geral, AIA(2,50)+BAP(1,00) se destacou em comparação à DBA(1,75)+BAP(1,00) com elevados valores no percentual de brotação, estágio de brotos, percentual de calogênese e taxa de formação de calos (Tab.1). A eficácia na utilização de misturas entre auxinas e citocininas na formação de mudas de videiras está em

consonância com trabalhos mais recentes no uso de reguladores de crescimento. Bidabadi *et al.* (2018) obtiveram valores satisfatórios na qualidade de calos com formulação a base de ANA e BAP, justificando este resultado pelo aumento da concentração de enzimas antioxidantes (catalase, peroxidases e ascorbato peroxidase) e menor formação de H₂O₂. Já Baron *et al.* (2019), salienta que o mais significativo efeito das citocininas em mistura a auxinas recai sobre sua interação ao longo da rota de sinalização das auxinas. As citocininas potencializam a regulação e distribuição das proteínas PIN, aumentando o transporte das auxinas durante a formação vascular.

Quanto às respostas das combinações E/PE tratadas, em relação ao CONTROLE (segunda premissa), o valor de RC_{invivo} foi positivo nas duas formulações (AIA(2,50)+BAP(1,00) e DBA(1,75)+BAP(1,00)) em comparação ao CONTROLE (C_{invivo}), em ordem crescente de resposta, para: 'Riesling'/'SO4', 'Bordô'/'P1103' e 'Bordô'/'SO4' (Fig.5B). Neste caso, as cultivares constituintes destas combinações genéticas apresentaram menor capacidade natural em induzir a calogênese, fazendo com que a utilização exógena dos reguladores de crescimento fosse necessária. Por outro lado, para a combinação 'Riesling'/'P1103' nenhuma formulação incrementou a qualidade da muda, de modo que, o tratamento CONTROLE, por si só, já foi suficiente em determinar a máxima qualidade da muda (Fig.5B). Inclusive, a utilização de qualquer formulação diminuiu a qualidade das mudas nesta combinação. Conforme Aloni (1980), em determinadas combinações genéticas, aumentos excessivos nas doses de auxinas acarretam danos fitotóxicos irreversíveis na ocorrência da calogênese (ação herbicida). Portanto, possivelmente foram os diversos fatores ligados a origem genética das combinações genéticas que modularam os valores do RC_{invivo} em relação ao C_{invivo}. Dentre estes fatores, se destacam os anatômicos e bioquímicos. Nos anatômicos, dentro de uma mesma espécie, o tipo de vascularização (especialmente área de xilema e quantidade de elementos de vasos) varia entre cultivares (Santarosa *et al.*, 2016). Ou seja, a qualidade do alinhamento vascular entre cultivar-copa e porta-enxerto, interfere no transporte químico e molecular, influenciando na formação da muda (Vahdati *et al.*, 2010). Quanto aos aspectos bioquímicos, tem se dado ênfase aos estudos relacionados ao acúmulo de compostos fenólicos (Assunção *et al.*, 2018), atividade de isoenzimas (Gökbayrak *et al.*, 2007) e balanço de fitohormônios (He *et al.*, 2018). Alterações no equilíbrio destes compostos ou no acúmulo das

suas formas fitotóxicas podem determinar ou impactar nos eventos de incompatibilidade. Além disso, estas variações bioquímicas podem ser distintas quando se considera as combinações de cultivares americanas (ex.: 'Bordô') em porta-enxertos híbridos (ex.: 'P1103' e 'SO4'), que são específicas do Brasil e não se dispõe de referências sobre incompatibilidade de enxertia.

Quanto a terceira premissa, ao se comparar as formulações candidatas à PADRÃO, de modo geral, obteve-se respostas similares nos enxertos em 'P1103' e 'SO4' (Fig.5B). Houve diferença significativa entre as formulações apenas na combinação 'Bordô'/SO4' (Fig.5B). Neste caso, o maior RC_{invivo} foi da PADRÃO seguido por AIA(2,50)+BAP(1,00) e por último DBA(1,75)+BAP(1,00). Porém, estas diferenças se justificaram pelos maiores valores da taxa de formação do calo e percentual de enraizamento verificado na PADRÃO (Tab.1). Nesta combinação, compostos presentes na própria cera podem ter proporcionado uma condição física que favoreceu o efeito do regulador de crescimento, potencializando seu efeito. Conforme Willhoft (1983) viscosidade, taxa de penetração e conteúdo de óleo em ceras parafínicas influenciam na formação das mudas de videiras. Isto ocorre tanto pela interação química entre os compostos associados às ceras, quanto seu efeito físico sobre o enxerto.

Apesar da diferença entre AIA(2,50)+BAP(1,00) e PADRÃO em 'Bordô'/SO4', não se considerou justificável sua exclusão como promissora. Além disso, os resultados em 'Bordô'/SO4' indicam que há espaço para ganhos no ajuste técnico da formulação promissora. Exemplo deste ajuste, que pode incrementar seu efeito, conforme Bidabadi *et al.* (2018), é o modo de aplicação. Neste trabalho, adotou-se por método de aplicação das formulações candidatas na validação, a aspersão ao longo da forçagem. Por outro lado, na PADRÃO foi empregada parafinagem na pré-forçagem. Neste caso, diferente das aplicações fracionadas, em aplicações únicas, tende-se a aumentar a concentração do regulador de crescimento (Bidabadi *et al.*, 2018). Além disso, conforme Todici *et al.* (2005) mesmo ao se aplicar auxinas na parte superior das plantas ocorre seu deslocamento e acúmulo na região basal, aumentando os níveis de enraizamento, pois seu movimento é basipetal. Assim, a maior concentração hormonal na etapa inicial da forçagem pode ser uma vantagem na indução da calogênese em cultivares de alta resposta aos reguladores de crescimento.

Na validação *in vivo* das combinações com 'VR043-43', não houve atendimento às três premissas. Na primeira, tanto para as formulações candidatas como para a PADRÃO os valores das variáveis da qualidade ficaram aquém daqueles considerados ideais para justificar a utilização de qualquer formulação. Conforme Regina *et al.* (2012), a forçagem é considerada satisfatória, apenas quando se obtém mudas com percentual de brotação e emissão de calos acima de 90%, o que não foi verificado em nenhuma formulação (Tab.1A e 1.C, respectivamente). Além disso, Hunter *et al.* (2013) consideram que mudas pós-forçagem são de alta qualidade quando apresentam calos de enxertia com espessura entre 2,0 e 3,0 mm de diâmetro, índice que também não foi obtido em nenhum tratamento (Tab.1E). Quanto a segunda e terceira premissas, na Fig.5B ocorreu baixo $C_{in vivo}$ e baixo $RC_{in vivo}$ indicando que este porta-enxerto tem baixa capacidade natural em induzir calogênese, mas também em responder ao estímulo do regulador de crescimento sintético. A cultivar VR043-43, por ser híbrido de *vitis rotundifolia*, historicamente apresenta baixos índices de formação de mudas a partir de estacas lenhosas (Botelho *et al.*, 2009). Tal fato, está associado ao distanciamento genético entre o enxerto e porta-enxerto (Köse e Gülerüç, 2016). Mayer *et al.* (2006) também destacam que 'VR043-43' apresenta barreiras anatômicas que restringem seu enraizamento e compatibilidade de enxertia. Apesar de valores insatisfatórios para ser considerada uma muda funcional, ocorreu vantagem estatística com a utilização da PADRÃO em relação às candidatas (Fig.5B). Assim, como em 'Bordô'/'SO4' tal fato pode estar associado a efeitos aditivos da própria cera.

Quanto à resposta da qualidade de calos e mudas em função da combinação E/PE, há evidências de que o $RC_{in vitro}$ foi menos influenciado que o $RC_{in vivo}$ (Fig.5C). Indiferente do porta-enxerto, o $RC_{in vitro}$ foi sempre superior a zero. Já para o $RC_{in vivo}$, algumas combinações genéticas apresentaram valores negativos. Ou seja, existiu uma limitação ao possível uso do co-cultivo ($RC_{in vitro}$) como preditor direto da qualidade da muda ($RC_{in vivo}$) pois o mesmo $RC_{in vitro}$ resultou em $RC_{in vivo}$ positivo ou negativo conforme a combinação genética. Na condição *in vivo*, o corte dos tecidos na enxertia sinaliza a ativação de uma cascata de reações moleculares (Enders e Strader, 2015), que provavelmente são distintas das respostas do corte dos calos fusionados *in vitro*. Além disso, em contraste aos calos, nas estacas vegetais, cada genótipo vêm acompanhado por um balanço específico de fitohormônios, capazes

de alterar a calogênese por si só (He *et al.*, 2018). Possivelmente foram as diferenças anatômicas dos tecidos internos dos caules seja o fator mais difícil de ser superado no processo *in vivo*, já que *in vitro* a união é apenas de tecidos não diferenciados ainda.

Apesar destas limitações, a utilização de variáveis mais detalhadas quanto a qualidade das fusões estabelecidas *in vitro* poderia resultar em associações mais diretas. Como em *Prunus*, em que Pina *et al.* (2009) obtiveram sucesso em discriminar cultivares homoenxertos de heteroenxertos *in vivo* a partir da análise da comunicação intercelular entre calos co-cultivados utilizando microscopia confocal. De qualquer forma, as relações verificadas entre RC_{invitro} e RC_{invivo} permitem explorar as potencialidades da estratégia testada neste trabalho. Por exemplo, em 'VR043-43', apesar de também haver vantagem do RC_{invivo} para 'Bordô', o RC_{invitro} foi alto e similar nos dois enxertos (Fig.5C). Ou seja, combinações genéticas com este porta-enxerto são potencialmente responsivas à utilização de reguladores de crescimento *in vitro*, mas limitados por fatores de origem genética quando enxertados *in vivo*. Este resultado indica potencialidade em aperfeiçoar a técnica de enxertia recomendada para esta cultivar. Conforme Botelho *et al.* (2009), enxertias em 'VR043-43' previamente enraizado no ano anterior, com enxertia na primavera do ano seguinte, possibilita induzir a calogênese. Mesmo assim, os quantitativos de mudas viáveis são baixos (em torno de 45%). Assim, a utilização do BAP(1,00) é uma proposta que poderá favorecer o aumento da proliferação dos calos neste tipo de enxertia.

5.5 Conclusões

A prospecção de formulações candidatas a partir do co-cultivo de calos *in vitro*, associada à sua validação *in vivo*, é satisfatória para prospecção de formulação promissora na utilização no sistema de enxertia de mesa nas combinações enxerto/porta-enxerto (E/PE) testadas.

A resposta da qualidade das mudas a formulação promissora, varia em função da capacidade natural das cultivares constituintes das combinações E/PE em induzir a calogênese. 'Riesling'/P1103' apresenta a menor resposta, enquanto que 'Bordô'/SO4', a mais alta.

Na condição *in vitro* a fusão dos calos é menos dependente da combinação E/PE do que a calogênese de enxertia *in vivo*. Este efeito é percebido

especialmente nas combinações com 'VR043-43' que é altamente responsivo ao regulador de crescimento *in vitro*, mas pouco na formação de mudas *in vivo*.

5.6 Referências bibliográficas

AAZAMI, M. 2010. Effect of some growth regulators on "in vitro" culture of two *Vitis vinifera* L. cultivars. Rom Biotechnol Lett. 15:5229-5232.

ALLEY CJ. 1957. Mechanized grape grafting: portable machine developed for bench or field grafting of grapes saves time and eliminates the need for skilled labor. Calif Agr. 11(6):3-12.

ALONI, R. 1980. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. Planta. 150:255-263.

ASSUNÇÃO M, PINHEIRO J, CRUZ S, BRAZÃO J, QUEIROZ J, DIAS JEE, CANAS S. 2019. Gallic acid, sinapic acid and catechin as potential chemical markers of *Vitis* graft success. Sci Hortic. 246:129-135.

BARON D, AMARO ACE, PINA A, FERREIRA G. 2019. An overview of grafting re-establishment in woody fruit species. Sci Hortic. 243:84-91.

BIDABADI SS, AFAZEL M, SABBATINI P. 2018. Iranian grapevine rootstocks and hormonal effects on graft union, growth and antioxidant responses of Asgari seedless grape. Hort Plant J. 4:1-15.

BOTELHO RV, SOUZA J, SCHREIDER E, PIRES EJP, TERRA MM. 2009. Propagação da videira 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca*) enxertada sobre o porta-enxerto 'VR-043-43' (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) [Propagation of the 'Niagara Rosada' grapevine (*Vitis labrusca*) grafted on the rootstock 'VR-043-43' (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*)]. Scientia Agrar. 10(5):359-364. Portuguese.

CELIK, H. 2000. The effects of different grafting methods applied by manual grafting units on grafting success in grapevines. Turk J Agric For. 24:499-504.

CLOG E, BASS P, WALTER B. 1990. Plant regeneration by organogenesis in *Vitis* rootstock species. Plant Cell Rep. 8:726-728.

EICHORN KW, LORENZ DH. 1977. Phaenologische entwicklungsstadien der rebe nachrichtemblaesche. Pflanzenschutzdienstes. 29:119-120.

ENDERS TA, STRADER LC. 2015. Auxin activity: past, present, and future. Am J Bot. 102(2):180-196.

- ERREA P, GARAY L, MARÍN JA. 2001. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using in vitro techniques. *Physiol. Plant.* 112(1):135-141.
- GABRIELSSON J, LINDBERG N-O, LUNDSTEDT, T. 2002. Multivariate methods in pharmaceutical applications. *J Chemom.* 16:141-160.
- GÖKBAYRAK Z, AKKURT M, ÇELİK H. 2007. Determination of grafting compatibility of grapevine with electrophoretic methods. *Sci Hortic.*113:343-352.
- HE W, WANG Y, CHEN Q, SUN B, TANG H-R, PAN D-M, WANG X-R. 2018. Dissection of the Mechanism for Compatible and Incompatible Graft Combinations of *Citrus grandis* (L.) Osbeck ('Hongmian Miyou'). *Int J Mol Sci.* 19(2):505.
- HELFER GF, BOCK F, MARDER L, FURTADO JC, COSTA AB DA, FERRÃO MF. 2015. Chemostat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados [Chemostat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados]. *Quim Nova.* 38(4):475-579. Portuguese.
- HOQUE A, ARIMA S. 2002. Overcoming phenolic accumulation during callus induction and in vitro, organogenesis in water chestnut (*Trapa Japonica Flerov*). *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 38(4):342-346.
- HUNTER JJ, VOLSCHEK CG, FOUCHE GW. 2013. Graft union abnormality: Some impacting factors. *Ciência e Técnica Vitivinícola.* 938-943.
- ILIEV A, DIMITROVA V, PEYKOV V, PRODANOVA–MARINOVA N. 2014. Technological Investigations for Improvement of Grapevine Propagation Material Production in Bulgaria. Part I. Results of affinity study and comparative testing of paraffins in the production of grafted rooted Turkish vines. *Turk J Agric For.* 1:1274-1279.
- JASKANI M, ABBAS H, SULTANA R, KHAN MM, QASIM M, KHAN IA. Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. CV. Perlette. *Pak J Bot.* 40:105-109, 2008.
- JIMÉNEZ VM, BANGERTH F. 2000. Relationship between endogenous hormone levels of grapevine callus cultures and their morphogenetic behavior. *Vitis.* 39(4):151-157.
- JIMÉNEZ VM. 2001. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Braz J Plant Physiol.* 13(2):196-223.

JONARD R, LUKMAN D, SCHALL F, VILLEMUR P. 1990. Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using in vitro techniques. *Sci Hortic.* 43:117-128.

OPA JUNIOR, SANTOS TCR, BRITO NM, RIBEIRO ML. 2002. Revisão das Propriedades, Usos e Legislação do Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) [Review of the Properties, Uses and Legislation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)]. *Cad Pesqui.* 13(1):60-70. Portuguese.

KAPARAKIS G, ALDERSON PG. 2003. Differential callus type formation by auxins and cytokinin in vitro cultures of pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Biosyst.* 137(3):275-280.

KHAN N, AHMED M, HAFIZ I, ABBASI N, EJAZ S, ANJUM M. 2015. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for in vitro shoot cultures, callos induction and shoot regeneration from caloses of grapes. *J Int Sci Vigne Vin.* 49(1):37-45.

KÖSE C, GÜLERYÜZ M. 2016. Effects of auxins and cytokinins on graft union of grapevine (*Vitis vinifera*). *New Zeal J Crop Hort.* 34(2):145-150.

KUMSA F. 2017. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of two grapevines (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Afr J Biotechnol.* 16(16):852-859.

LAJEUNESSE M. 2011. On the meta-analysis of response ratios for studies with correlated and multi-group designs. *Ecology.* 92:2049-2055.

LIU J, X HU, P QIN, K PRASAD, Y HU, L XU. 2018. The WOX11-LBD16 pathway promotes pluripotency acquisition in callus cells during de novo shoot regeneration in tissue culture. *Plant Cell Physiol.* 59(4):734-743.

MASTUTI R, MUNAWARTI A, FIRDIANA ER. 2017. The combination effect of auxin and cytokinin on in vitro callus formation of *Physalis angulata* L. – A medicinal plant. In: Salunkhe C, Kikuchi A, Govinda B, Jatmiko YD, Siswanto D, editors. ICGRC 2017. Proceedings of the 8th International conference on global resource conservation; July 19-20; Malang. Malang: AIP. p.1-6.

MATOS FJA. 1997. Introdução a fitoquímica experimental [Introduction to experimental phytochemistry]. 2th ed. Fortaleza: Edições UFC. Portuguese.

MAYER JLS, BIASI LA, BONA C. 2006. Capacidade de enraizamento de estacas de quatro cultivares de *Vitis* L. (Vitaceae) relacionada com os aspectos anatômicos [Rooting ability of four *Vitis* L. (Vitaceae) cultivar cuttings related to anatomy]. *Acta Bot Bras.* 20(3):563-568. Portuguese.

MELLO LMR de. 2016. O Brasil no contexto do mercado vitivinícola mundial: panorama 2015 [Brazil in the context of the world wine market: panorama 2015]. Bento Gonçalves: Brazilian Research Corporation EMBRAPA. (Technical Release; 192). Portuguese.

MELLO LMR de, MACHADO CAE. 2017. Data from: Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul: 2013 a 2015 [Viticultural Register of Rio Grande do Sul: 2013 at 2015] [dataset]. EMBRAPA Repository. [accessed 2020 Jun 05]. <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/cadastro-viticola>. Portuguese.

MII M, ZOU Y-M, SUGIYAMA T, YANAGIHARA S, IIZUKA M. 1991. Frequency callus formation from protoplasts of *Vitis labruscana* Bailey and *Vitis thunbergii*. *Sci. Hortic.* 46:253-260.

MIERZIAK J, KOSTYN K, KULMA A. 2014. Flavonoids: as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules.* 19:16240-16265.

MURASHIGE T, SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497.

NACHTIGAL JC, SCHNEIDER EP. 2007. Recomendações para produção de videiras em sistemas de base ecológica [Recommendations for the production of vines in ecologically based systems]. Bento Gonçalves: Brazilian Research Corporation EMBRAPA. (DOCUMENTS; 65). Portuguese.

NANDA A, MELNYK CW. 2018. The role of plant hormones during grafting. *J Plant Res.* 131(1):49-58.

PEDERSEN BH. 2006. Determination of graft compatibility in sweet cherry by a co-culture method. *J Hortic Sci Biotech.* 81(4):759-764.

PINA A, PILAR E, ALEXANDER S, MARTENS H. 2009. Cell-to-cell transport through plasmodesmata in tree callus cultures. *Tree Physiology.* 29:809-818.
R CORE TEAM. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

REGINA MA. 2002. Produção e certificação de mudas de videira na França 1: Situação atual da produção [Production and certification of grapevines plants in France 1: A Production Overview]. *Rev Bras Frutic.* 24(2):586-589. Portuguese.

REGINA MA, SOUZA CR, DIAS FAN. 2012. Propagação de *Vitis* spp. pela enxertia de mesa utilizando diferentes porta-enxertos e auxinas [Propagation of *Vitis* spp. by bench grafting table using different rootstocks and auxins]. *Rev Bras Frutic.* 34(3):897-904. Portuguese.

SANTAROSA E, SOUZA PVD de, MARIATH JE de A, LOUROSOSA G V. 2016. Alterações anatômicas do sistema vascular em porta enxertos de videira [Anatomic changes of the vascular system in grapevine rootstocks]. *Pesq Agropec Bras.* 51(4):320-329. Portuguese.

SOUZA AV, PEREIRA AMS. 2007. Enraizamento de plantas cultivadas in vitro [In vitro cultivated plant's rooting]. *Rev Bras PI Med.* 9(4):103-117. Portuguese.

SRNGH Z, BRAR SJS. 1993. In vitro plant regeneration in seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Vitis.* 32:229-232.

TODIC S, TESIC D, BESLIC Z. 2005. The effect of certain exogenous growth regulators on quality of grafted grapevine rootlings. *Plant Growth Regul.* 45(2):121-126.

VAHDATI K, HASSANI D, REZAAE R. 2010. Walnut grafting success as affected by different grafting methods, cultivars and forcing treatments. *Acta hortic.* 861:345-352.

VARVEL GE. 2000. Crop rotation and nitrogen effects on normalized grain yields in a long-term study. *Agron J.* 92:938-941.

VRŠIČA S, PULKOA B, KOCSISB L. 2015. Factors influencing grafting success and compatibility of grape rootstocks. *Sci Hortic.* 181(2):168-173.

ZANUS MC. 2016. Panorama da vitivinicultura brasileira [Panorama of Brazilian vitiviniculture]. In: Garrido LR da editor. CLAVE 2015. Proceedings of the 15th Latin American Congress of Viticulture and Oenology and the 13th Brazilian Congress of Viticulture and Oenology; November 3-7; Bento Gonçalves. Bento Gonçalves: Brazilian Research Corporation EMBRAPA. p. 217. Portuguese.

ZHOU Q, GAO B, LI W-F, MAO J, YANG S-J, LI W, MA Z-H, ZHAO X, CHEN B-H. 2020. Effects of exogenous growth regulators and bud picking on grafting of grapevine hard branches. *Sci Hortic.* 264:109-186.

WAITE H, WHITELAW-WECKERT M, TORLEY P. 2015. Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine planting material. *New Zeal J Crop Hort.* 43(2):144-161.

WILLHOFT F. 1983. Wachse fer die WeinRebenveredlung. *Fette Seifen Anstr.* 85(2):86-90.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho foi baseado em três linhas de pesquisa. Uma aplicada, envolvendo práticas fitotécnicas em viveiros e duas básicas, contemplando áreas da bioquímica e biotecnologia. A partir da integração entre estas linhas o objetivo geral da presente tese foi atingido, gerando-se conjunto de informações a serem utilizadas na rotina dos viveiros no Sul do Brasil. Na linha fitotécnica as diferenças de qualidade das mudas entre anos, mostraram que a utilização da câmara frigorífica é essencial aos viveiros no Sul do Brasil. Da mesma forma, a atual prática de aguardar o máximo acúmulo do frio de campo ou a iminência de brotação para a coleta de estacas, pode ser substituída pela coleta calendarizada, durante os meses de junho e julho, submetendo o material vegetal a exposição de pelo menos 30 dias de frio artificial. Adicionalmente, a utilização do etefon em final de abril, mostrou-se prática promissora, na antecipação da coleta de materiais vegetais até o final de maio, sem danos à qualidade das mudas, desde que a coleta respeite o limite de 90 dias de armazenamento em câmara frigorífica. Com estes ajustes, viveiristas passam a definir de forma mais estável entre anos seu calendário de coleta, enxertia e plantio. A definição de um procedimento operacional padrão permitirá ao viveirista a produção em escala, com menor dependência de condições ótimas de campo e maior estabilidade da qualidade da muda entre anos.

Quanto às linhas metodológicas, estas foram validadas como promissoras na caracterização da qualidade fisiológica de mudas. A utilização de LC-MS/MS mostrou-se com alta sensibilidade em determinar alterações no perfil fitohormonal das mudas frente aos múltiplos fatores de manejo. Dentre as metodologias aplicadas neste trabalho, certamente esta é a que está em plena expansão no meio científico atual, dada as recentes publicações na área. Já o co-cultivo de calos *in vitro* mostrou-se potencial para agregação de conhecimento em estudos relacionados a compatibilidade de enxertia. Na abordagem aplicada neste trabalho, visando a prospecção de compostos indutores de calogênese, obteve-se proposta

metodológica para outras culturas. Como pontos negativos, em ambas as metodologias, exigem-se recursos, equipe especializada e estrutura laboratorial preparada. Porém, na garantia de equivalência mínima no desenvolvimento científico nacional, frente a grupos de pesquisas internacionais, o fomento a este tipo de investimento torna-se inevitável.

No que se refere a abordagem estatística aplicada neste trabalho, comprova-se a viabilidade e confiabilidade da análise exploratória multivariada como ferramenta robusta capaz de identificar padrões sutis em dados com elevado grau de interação e confundimento. Em um ambiente de campo cada vez mais variável e imprevisível, associado a recorrente carência de recursos e mão-de-obra, o delineamento de ensaios confiáveis, porém otimizados torna-se um dos desafios do pesquisador moderno.

Finalmente, destaca-se o potencial para trabalhos futuros dentro dos temas abordados nos três capítulos. Dentre as possíveis linhas a serem exploradas, de forma mais ampla, ficou evidente a elevada dependência da qualidade de mudas às diferentes combinações genéticas. Assim, na busca pela máxima e estável qualidade na formação de plantas de videira, o ajuste fino das práticas propostas, por grupos genéticos equivalentes, poderá ser aprofundado.