

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS INVERTASES INFLUENCIA O ACÚMULO
DIFERENCIAL DE AÇÚCARES EM BAGAS DE *Vitis vinifera* E *Vitis labruscana***

MICKAELA MOREIRA DOS SANTOS

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES -
RJ 2022**

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS INVERTASES INFLUENCIA O ACÚMULO
DIFERENCIAL
DE AÇÚCARES EM BAGAS DE *Vitis vinifera* E *Vitis labruscana*

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

Orientador: Prof. Ricardo Bressan-Smith
Campos dos Goytacazes – RJ
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

null.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS INVERTASES INFLUENCIA O ACÚMULO DIFERENCIAL DE AÇÚCARES EM BAGAS DE *Vitis vinifera* E *Vitis labruscana* / Mickaela Moreira dos Santos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

35 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.

Orientador: Ricardo Enrique Bressan Smith.

1. Uva . 2. Floema . 3. Açúcares . I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS INVERTASES INFLUENCIA O ACÚMULO DIFERENCIAL DE AÇÚCARES EM BAGAS DE *Vitis vinifera* E *Vitis labruscana*.

Mickaela Moreira dos Santos


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

Aprovada em 31 de Março de 2022

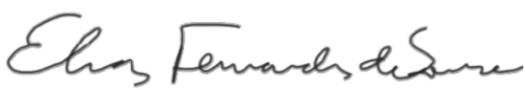
Comissão examinadora



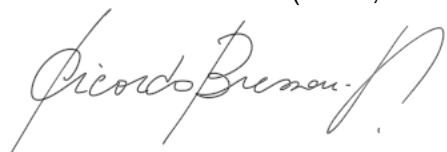
Gleidson Morais de Souza (D.S.c., Produção Vegetal) - EMATER/MG



Laís Moro (D.S.c., Ciência dos Alimentos) – USP



Prof. Elias Fernandes de Sousa (D.Sc., Produção Vegetal)- UENF



Prof. Ricardo Bressan-Smith- (D.S.c., Fisiologia Vegetal-UENF) (Orientador)

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMENTOS	vi
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 <i>Vitis</i>	9
2.2. Morfologia e crescimento da baga	9
2.3. Movimento da seiva do floema	11
2.4. Translocação e distribuição da seiva floemática na baga.	13
3. METODOLOGIA	17
3.1. Material vegetal avaliado	17
3.2. Análises qualitativas do desenvolvimento das bagas	17
3.2.1. Diâmetro e Sólidos solúveis totais	17
3.2.2. Deformabilidade das bagas	18
3.3. Atividade enzimática da Invertase Ácida do mesocarpo	18
3.3.1. Obtenção do extrato enzimático	18
3.3.2. Determinação das atividades das invertases solúvel e insolúvel	19
3.4. Coleta da seiva apoplástica e vacuolar	19
3.5.1. Determinação da concentração de açúcares da baga	20
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

As rotas de descarregamento do floema mudam em resposta ao desenvolvimento de uvas e essas modificações são resultados de alterações no número e na condutividade dos plasmodesmos. Ainda não está claro como os solutos, após serem descarregados do floema, são armazenados nos vacúolos do mesocarpo e no apoplasto das bagas, nem informações relacionadas à maturação e à composição floemática, apesar da sua importância para entender o movimento de água nas bagas. Portanto, o objetivo geral deste projeto é compreender se há um padrão diferencial de acúmulo de açúcares solúveis e se há influência da via de descarregamento do floema no amadurecimento em bagas de *Vitis vinifera* e *Vitis labruscana*. Para isso, foram usadas bagas em *V. labruscana* var. Niagara Rosada e *V. vinifera* var. Chardonnay. Análises qualitativas como diâmetro, SST e deformabilidade foram feitas para acompanhar o desenvolvimento das bagas. Para acompanhar as alterações de composição de solutos durante o amadurecimento, a seiva apoplástica foi extraída com auxílio da bomba de pressão Scholander quantificada em HPLC para calcular as concentrações de açúcares solúveis presentes no vacúolo e no apoplasto. Em contraste, a atividade da enzima invertase ácida vacuolar (IAV) e invertase ácida de parede celular (IAPC) foram mensuradas indicando a rota de descarregamento do floema. resultados mostram que as análises qualitativas ilustraram as mudanças fisiológicas que ocorreram no mesocarpo durante o desenvolvimento das bagas. Em *V. labruscana*, as concentrações de açúcares solúveis durante o amadurecimento, acumularam-se somente no apoplasto aos 95 DAA. Diferentemente em *V. vinifera*, os açúcares solúveis estão armazenados tanto no vacúolo quanto no apoplasto. Em *V. labruscana*, as invertases vacuolares perdem atividade justamente quando a invertase de parede celular aumentou sua atividade que até então mantinha-se em baixa atividade e após, ambas diminuíram a atividade. Em *V. vinifera*, a invertase vacuolar predominou sua atividade sobre a invertase de parede celular e ambas as enzimas tiveram atividade reduzida no final do amadurecimento. Portanto, conclui que há um padrão diferencial sobre como ocorre o acúmulo de açúcares na baga. A via de descarregamento do floema altera o armazenamento dos açúcares solúveis e essas mudanças variam de acordo com a variedade.

Palavras-chave: Uva, floema, açúcares.



ABSTRACT

Phloem unloading routes change in response to grape development and these changes are a result of changes in the number and conductivity of plasmodesmata. It is still unclear how the solutes, after being discharged from the phloem, are stored in the vacuoles of the mesocarp and in the apoplast of the berries, nor information related to maturation and phloem composition, despite its importance to understand the movement of water in the berries. Therefore, the aim of this project is to understand if there is a differential pattern of accumulation of soluble sugars and if there is an influence of the phloem unloading pathway on ripening in *Vitis vinifera* and *Vitis labruscana*. For this, in this work, varieties *V. labruscana* (Niagara rosada) and *V. vinifera* (Chardonnay) were used during their development. Qualitative analyzes such as diameter, SST and deformability were carried out to monitor the development of the berries. To follow the changes in solute composition during the ripening of the berries, the apoplastic sap was extracted with the aid of a Scholander pressure pump. The extracted sap was quantified in HPLC to calculate the concentrations of soluble sugars present in the vacuole and in the apoplast, for both varieties. In contrast, the activity of the enzyme vacuolar acid invertase (IAV) and cell wall acid invertase (IAPC) were measured, indicating the phloem unloading pathway. These results show that qualitative analyzes illustrated the physiological changes that occurred in the mesocarp during berry development. In *V. labruscana*, concentrations of soluble sugars during ripening accumulated, only in the apoplast, at 95 DAA. Unlike in *V. vinifera* at 93 DAA, soluble sugars are stored in both the vacuole and the apoplast. In *V. labruscana*, vacuolar invertases lose activity precisely when cell wall invertase increased its activity, which until then remained at low activity, and afterwards, both lose activity. In *V. vinifera*, vacuolar invertase predominated over cell wall invertase and both enzymes had reduced activity at the end of ripening. Therefore, it is concluded that there is a differential pattern on how sugar accumulation occurs. The phloem unloading pathway alters the storage of soluble sugars and these changes vary by variety.

Keywords: Grape, phloem, sugars.



AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Agradeço, também, à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pelo ensino;

Agradeço ao meu orientador, Ricardo Bressan, por mais uma vez ter compartilhado seu aprendizado e experiências, com toda paciência comigo durante todos esses anos;

Agradeço aos meus colegas de laboratório, em especial, Eduardo Monteiro, Tamires Ribeiro e Ana Carolina Machado, por não medirem esforços para me ajudar em todos os experimentos e estarem sempre felizes comigo durante essa jornada.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ricardo Bressan', is located in the bottom right corner of the page.

1. INTRODUÇÃO

A seiva do floema é transportada pelos elementos de vaso e é descarregada nos tecidos drenos, tendo como exemplo, a baga. As rotas de descarregamento do floema mudam em resposta ao desenvolvimento dos frutos, e essas modificações são resultados de alterações no número e na condutividade dos plasmodesmos (Patrick, 1997; Van Bel, 2003). Por exemplo, em bagas da variedade Kyoho (*Vitis vinifera* x *V. labrusca*) o descarregamento simplástico predomina nas fases iniciais e intermediárias do desenvolvimento e os plasmodesmos têm papel crucial para a predominância dessa via. Entretanto, os plasmodesmos perdem sua funcionalidade na fase de maturação e, então, o modo de descarregamento predominante começa a ser o apoplástico (Zhang et al., 2006). Essa mudança do floema isola as células do pericarpo dos elementos de vaso e das células companheiras, fazendo com que a baga acumule solutos sem inibir o influxo do floema (Patrick, 1997; Lalonde et al., 2003).

Keller e Shereta (2014) demonstraram que os genótipos Concord (*V. labrusca*) e Merlot (*V. vinifera*) diferem em sua capacidade de manter a integridade da membrana na maturidade. Os autores sugerem que os solutos acumulados no apoplasto da baga são rigidamente regulados e sob controle de desenvolvimento. As hexoses se acumulam nos vacúolos e apoplasto em taxas diferentes. Os ácidos orgânicos, especialmente o malato, diminuem nos vacúolos. Em Concord, ao contrário, o potássio aumenta nos vacúolos, mas diminui no apoplasto. Tilbrook e Tyerman (2008) confirmaram esses dados, usando corantes indicadores, que revelaram diferenças na viabilidade celular do mesocarpo entre genótipos de uva (Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008; Fuentes et al., 2010).

Na maioria dos genótipos, a morte celular ocorre no final do amadurecimento da baga, iniciando um fenômeno denominado murcha das bagas (em inglês, *berry shrivelling*), sendo identificado, por exemplo, na variedade Shiraz (*V. vinifera*) (Tyerman et al., 2004). O genótipo Niagara Rosada (*V. labruscana*) apresenta predisposição à ocorrência de perda de vitalidade das células do mesocarpo a partir do *veraison*, ao mesmo tempo em que o fluxo do xilema da planta-mãe para as bagas é interrompido. Essa ocorrência de perda de vitalidade celular pode ter uma relação direta com a consistência do mesocarpo, conforme se avança o amadurecimento da baga, e esse



fenômeno é percebido pela consistência do mesocarpo que passa a apresentar menor firmeza, com consistência do mesocarpo gelatinoso e com cerca de 80% das membranas celulares com sinais de perda de vitalidade (Lerin, 2016; Baritiello, 2018). Além disso, a casca é espessa e revestida por uma camada de cera, que dificulta a perda de água por transpiração. Isto possibilita a manutenção de características físicas e químicas por um período mais prolongado, como visto por Lerin (2016). Lang e During (1991) sugeriram que a perda de integridade das células do mesocarpo é um acontecimento normal do desenvolvimento da baga. Isso explicaria a perda generalizada do conteúdo celular para o apoplasto, levando à perda da viabilidade celular, da firmeza e pressão da parede da célula.

Diante desse cenário, ainda não está claro como os solutos, após serem descarregados do floema, são armazenados nos vacúolos do mesocarpo e no apoplasto das bagas, nem informações relacionadas à maturação e à composição floemática, apesar da sua importância para entender o movimento de água nas bagas. Portanto, o objetivo geral deste projeto é compreender se há um padrão diferencial de acúmulo de açúcares solúveis e se há influência da via de descarregamento do floema no final do amadurecimento em variedades de *V. vinifera* e *V. labruscana*.



2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Vitis*

A videira pertence ao gênero *Vitis*, que compreende mais de 60 espécies selvagens interférteis distribuídas na Ásia, na América do Norte e na Europa, sob condições climáticas temperadas, subtropicais, mediterrâneas e continentais. Entre as diferentes espécies existentes, algumas atraem interesse econômico, pois possuem frutos com características para o consumo *in natura* ou para a elaboração de vinhos e sucos, como a espécie europeia *Vitis vinifera* e as espécies americanas *V. labrusca*, *V. labruscana*, *V. bourquina* e *V. rotundifolia* (Camargo, 2021).

As uvas cultivadas recebem duas classificações: uvas para mesa e uvas para vinho, que são derivadas de cultivares de *V. vinifera*. A espécie de maior importância econômica no mundo é a *V. vinifera*, que apresenta grande número de cultivares, tanto para vinho quanto para mesa e produção de passas. A segunda espécie em relevância, pela extensão da área cultivada no mundo, é a *V. labrusca*, sendo o número de suas cultivares limitado a algumas dezenas. As uvas de *V. labrusca* são utilizadas para consumo *in natura* e para processamento; em especial, para a elaboração de suco de uva, em alguns países da América e da Ásia, e para elaboração de vinhos comuns. A *V. labruscana* é um subgrupo de uvas originárias de uma hibridização de *V. labrusca* e *V. vinifera*. Exemplos populares incluem as uvas Concord e Niagara. O cultivo de *V. bourquina* é limitado a poucas cultivares e restrito a algumas zonas. O número de cultivares de *V. rotundifolia* também é pequeno, e seu plantio comercial tem importância apenas no Centro-Sul dos Estados Unidos (Moura, 2021).

2.2. Morfologia e crescimento da baga

A uva é uma baga originária do ovário. A porção carnosa provém da parede do ovário que origina o pericarpo, mesocarpo e endocarpo, sendo o mesocarpo a “carne” comestível da baga (Figura 1). A uva em desenvolvimento é alimentada por fotoassimilados através dos feixes vasculares carpelares, que são divididos nos feixes



periféricos e centrais. Tanto nos feixes carpelares maiores quanto nos menores, existem conexões simplásticas através de plasmodesmatos entre o complexo de elementos crivados (EC), células companheiras (CC) e células do parênquima do floema (CPF). Existem mais plasmodesmas entre EC e CC do que entre as CPF, e isso vale para todo o desenvolvimento da baga (Zang et al., 2006).

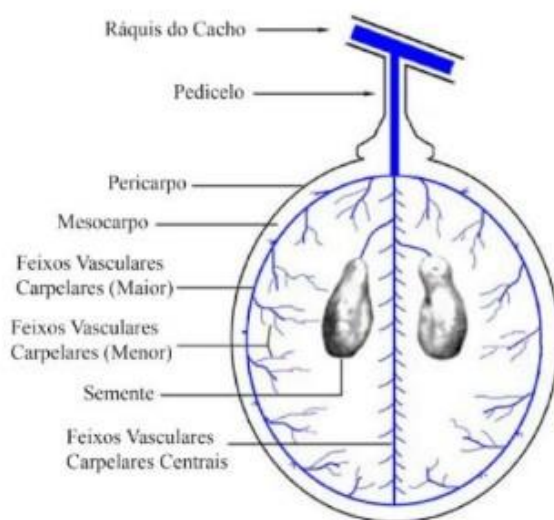


Figura 1: Estrutura de baga da uva. Fonte: (Zang et al., 2006).

O desenvolvimento das bagas é caracterizado por um crescimento em volume acompanhado pela evolução das características físicas e químicas. Seu padrão de crescimento evolui de acordo com uma curva sigmoideal dupla que é definida por três fases de crescimento: a primeira de formação é marcada por um crescimento rápido, com metabolismo intenso, respiração elevada e um rápido acúmulo de ácidos. A segunda fase é uma fase de crescimento lento durante a qual o *veraison* ocorre. O *veraison* é caracterizado pelo amolecimento da polpa e pelo aparecimento de cor em variedades coloridas e uma casca translúcida em variedades brancas (Coombe, 1976). Ainda nessa fase, o fluxo do xilema, para alguns genótipos, é interrompido. A terceira fase corresponde à maturação. O crescimento celular é retomado e é acompanhado por diversas modificações fisiológicas. A intensidade respiratória diminui, enquanto certas atividades enzimáticas aumentam acentuadamente. Durante essa fase, a uva acumula açúcares livres, potássio, aminoácidos e compostos fenólicos, enquanto as concentrações de ácido

diminuem. O tamanho da uva na maturidade depende em grande parte desses processos de acumulação, mas também do número de células por baga (Ribéreau-Gayon et al., 2003). Estas fases são representadas na Figura 2.

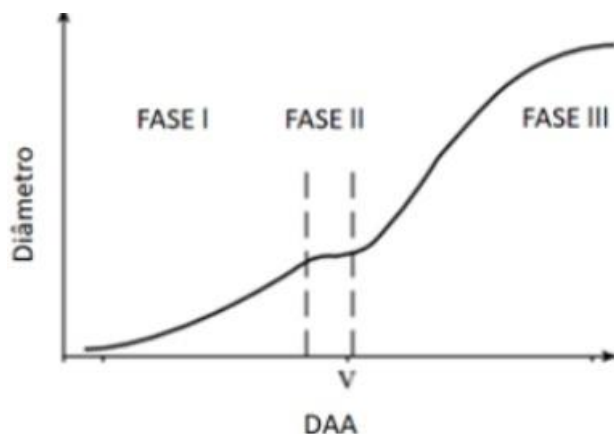


Figura 2: Variação de diâmetro nas fases de desenvolvimento da baga da uva. DAA: dias após a antese (Fonte: Ribéreau- Gayon et al., 2003).

O acontecimento de tais mudanças no metabolismo da baga parece ser um processo coordenado que leva ao completo amadurecimento, porém, outros fatores vêm ganhando importância neste contexto. Entre esses fatores destacam-se a perda da vitalidade celular (Lang e Thorpe, 1989; Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008; Fuentes et al., 2010) e mudanças nas relações hídricas (fluxo via xilema e floema) entre planta-mãe e fruto, e entre células e tecidos (Greenspan et al., 1996; Bruce, 2003; Rogiers et al., 2004; Tyerman et al., 2004; Bondada et al., 2005).

2.3. Movimento da seiva do floema

O suprimento de água para o crescimento de muitos frutos de polpa carnosa ocorre principalmente através do xilema, durante o desenvolvimento inicial dos frutos e, principalmente, através do floema nos estágios posteriores, especialmente durante o amadurecimento (Choat et al., 2009). Supõe-se, então, que a demanda de água dos frutos em amadurecimento se torna dependente do influxo do floema, porque o influxo do xilema diminui (Cuéllar et al., 2013). Assim, o declínio no influxo do xilema foi atribuído por

muito tempo ao isolamento hidráulico do fruto da planta-mãe e por danos na morfologia do xilema (Düring et al., 1987; Findlay et al., 1987; Dražeta et al., 2004).

O principal composto translocado pelo floema das videiras, além da água, é a sacarose (Swanson e El-Shishiny, 1958; Koblet, 1969). Esse açúcar é responsável por 50 a 70% da pressão osmótica. O fluxo de massa no floema é resultante do gradiente osmótico criado pela sacarose, mas também outros solutos, como potássio, aminoácidos, glicose, frutose, e malato que compõem grande parte dos componentes osmóticos (Patrick, 1997; Peuke et al., 2001; Peuke, 2010).

A composição da seiva do floema é variável entre espécies, cultivares e porta-enxertos e varia de acordo com as condições fisiológicas, época do cultivo e estação do ano. Os solutos também podem ser transferidos entre o floema e o xilema (Lalonde et al., 2004; Metzner et al., 2010). Esse processo favorece a entrega de nutrientes para os órgãos drenos, as raízes e brotações, redirecionando os solutos entregues pelo floema para manter as concentrações de nutrientes do xilema (Keller, 2015).

A seiva do floema normalmente se move às velocidades de fluxo de 0,25 - 0,40 mm s⁻¹ (Koblet, 1969; Windt et al., 2006) que é muito mais rápida do que seria esperado com a difusão simples. Em contraste com o xilema, a taxa e a direção do movimento do soluto no floema estão sob controle metabólico e é alterada de acordo com o tempo, em resposta ao desenvolvimento de órgãos fontes e dreno. Assim, a direção do fluxo do floema, pode ser revertido ao longo do tempo e, muitas vezes, é contra a direção do fluxo de transpiração no xilema (Keller, 2015).

A teoria do fluxo de pressão do movimento da seiva do floema desenvolvida por Münch em 1930 afirma que a seiva se movimenta de locais de alta pressão de turgor ($P = \Psi_p$) para locais de baixa pressão dentro do floema (Figura 3).

Por outra parte, a sacarose não é apenas a principal forma de transporte de carbono, no sistema de floema, mas é também, seu combustível, ou seja, a força motriz osmótica para o fluxo de massa ocorrer (Munch, 1930; Hellmann et al., 2000; Van Bel, 2003). As células-fonte “carregam” sacarose nos elementos de vaso, o que resulta em um gradiente osmótico ($\Delta\Psi_{\pi}$), que gera um gradiente de potencial hídrico ($\Delta\Psi$). Isso atrai a água do xilema para os elementos de tubo crivado, aumentando a pressão do turgor (P). Em outras palavras, o transporte do floema depende da pressão hídrica gerada na fonte.

A seiva, então, se move em direção ao dreno onde a sacarose será descarregada,



o que leva à perda de água no elemento de tubo crivado, de modo que a pressão de turgor se torna mais baixa. O movimento da água para dentro e para fora do floema é modulado pelo potencial hídrico, enquanto o movimento da água dentro do floema (da fonte ao dreno) é acionado pela diferença de pressão entre a fonte e o dreno que, por sua vez, é gerado por carregamento (na fonte) e descarregamento (no dreno) de açúcar e outros solutos (Münch, 1930; Bradford, 1994; Patrick, 1997; Van Bel, 2003).

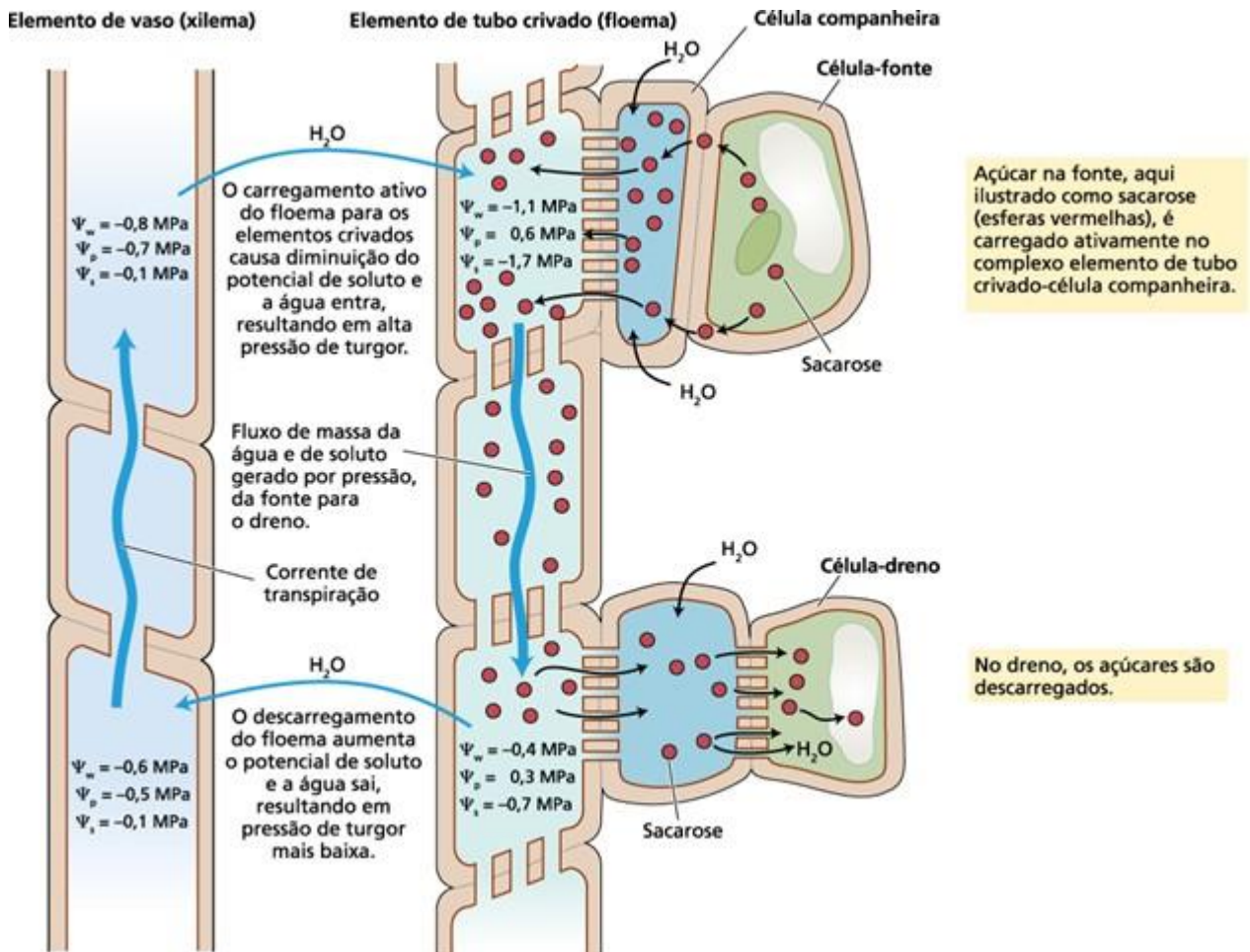


Figura 3: Representação esquemática do movimento da seiva do floema de regiões de alta pressão em regiões fonte para regiões com baixa pressão em drenos. Os círculos roxos representam transportadores de soluto. Todos os valores estão em MPa (Fonte: Taiz e Zeiger, 2016).

2.4. Translocação e distribuição da seiva floemática na baga.

Entender o processo de amadurecimento da uva é importante para definir seu ponto de colheita. Seja para produção de vinho ou consumo *in natura*. Assim, uma das principais características do processo de amadurecimento nas bagas de uva é pelo acúmulo de glicose e frutose no vacúolo. Em videiras, a sacarose produzida da

fotossíntese é transportada através do floema para a baga (Swanson e Elshishiny, 1958), onde é quebrada em glicose e frutose que se acumulam em quantidades aproximadamente iguais (Davies e Robinson, 1996).

O movimento molecular e iônico de um local para outro é conhecido como transporte. O transporte local de solutos para dentro ou dentro de células é regulado principalmente por proteínas de membrana. O transporte, em maior escala, entre os órgãos vegetais ou entre eles e o ambiente, também é controlado pelo transporte de membranas em nível celular (Taiz e Zeiger, 2016).

O acúmulo de frutose e glicose começa no *veraison*, que corresponde ao início da maturação dos frutos e continua durante todo o amadurecimento. A invertase (P-fructosidase; EC 3.2.1.26) catalisa a conversão de sacarose em frutose e glicose e é comum em frutos carnosos que acumulam açúcar, como o tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Yelle et al., 1991; Stommel, 1992).

A maneira pela qual as videiras carregam sacarose no floema é controversa. Alguns pesquisadores argumentam que o carregamento ocorre via apoplasto, ou seja, através das paredes celulares, porque a concentração de sacarose no interior do floema é muito maior do que nas células circundantes, já que a difusão contra um gradiente de concentração não seria possível. Se isto for verdade, a sacarose deve ser descarregada ou ser bombeada para as paredes celulares e depois ser bombeada através das membranas celulares das CC e pelos elementos de seiva por cotransporte de prótons (ou simporte), um processo que requer gasto de energia na forma de ATP (Lalonde et al., 2003; Carpaneto et al., 2005; Chen et al., 2012).

Antes que a sacarose possa ser transportada das folhas para os órgãos drenos ela deve entrar no floema por um processo conhecido como carregamento do floema. O mecanismo mais comum é o carregamento apoplástico, que é ativo, onde a sacarose que entra no apoplasto e é bombeada para os elementos de tubo crivado, por transportadores ligados à membrana, usando energia derivada da força motriz do próton (Sauer, 2007). O carregamento simplástico é passivo, uma vez que a entrada de sacarose é contínua através de plasmodesmos (Schulz, 2005).

Após o carregamento do floema, a seiva floemática é transportada através de tubos crivados para órgãos drenos, onde são descarregados para diversos usos. O descarregamento simplástico nesta via promove hidrólise da sacarose em hexoses de



glicose e frutose pela invertase ácida solúvel ou pela sacarose sintase, após atingir os feixes vasculares do fruto. Estas moléculas são usadas para sintetizar macromoléculas insolúveis (amido, proteína ou lipídio) ou armazenadas nos vacúolos para manter um gradiente de concentração de açúcares (Figura 4A). A via apoplástica atua em espaços intercelulares na parede celular, chamado de apoplasto e opera contra o gradiente de concentração. Nesta via, a sacarose é quebrada em hexoses pelas invertases ácidas da parede celular, antes de serem bombeadas para o citoplasma, onde podem ser novamente convertidos em sacarose, pela sacarose sintase, ou acumuladas no vacúolo, apenas para serem hidrolisadas novamente, dependendo da necessidade do metabolismo de açúcares (Keller, 2015) (Figura 4B).

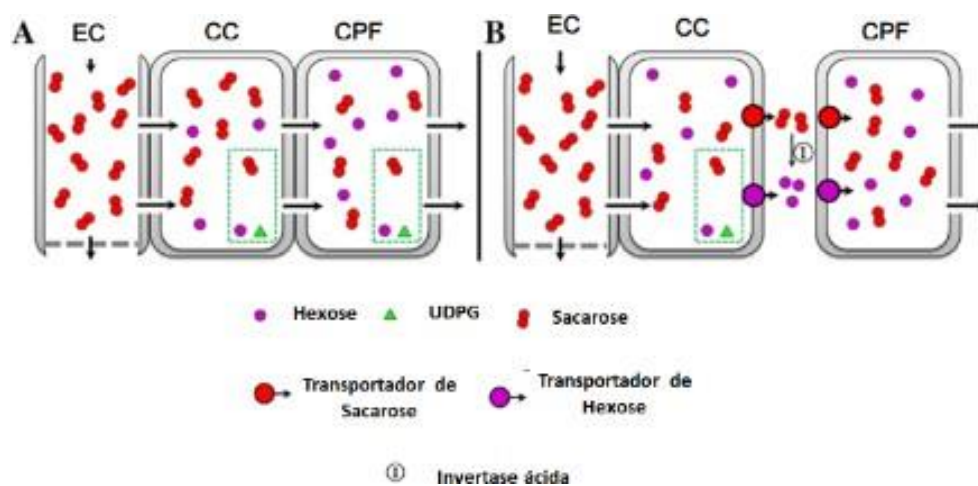


Figura 4: Modelo hipotético de estratégias de descarregamento do floema: A: Descarregamento simplástico para sacarose. B: Descarregamento apoplástico para sacarose. EC: Elementos crivados; CC: Células companheiras; CPF: Células parenquimáticas do feixe (Adaptado de Ma et al., 2018).

Como dito anteriormente, a sacarose é o principal produto da fotossíntese. É produzida no citoplasma, proveniente dos produtos da fotossíntese ou da utilização de reservas e pode seguir vários destinos. O principal destino é movendo-se célula a célula via plasmodesmas ou em uma rota alternativa cruzando a membrana plasmática para poder entrar no espaço entre a parede celular, o apoplasto (Ayre e Brian G, 2011). Após a clivagem da sacarose no apoplasto, as hexoses resultantes são transportadas através da

Handwritten signature

membrana plasmática contra um gradiente eletroquímico através de simportes, ou seja, o H^+ se move a favor de seu gradiente para mover a sacarose do citoplasma para o vacúolo.

Estudos recentes de Keller e Shereta (2014) com Concord (*V. labrusca*) e Merlot (*V. vinifera*) mostraram que no final do amadurecimento de Concord, houve aumento do pH do apoplasto quando houve diminuição do tartarato. Os autores explicam a existência de um ΔH^+ entre vacúolos e apoplasto durante a maior parte da fase de amadurecimento e seu desaparecimento rápido em Merlot quando madura, semelhante ao que ocorre em tomates (Almeida e Huber, 1999), sugere que as membranas do mesocarpo permanecem intactas até o final do amadurecimento e que os genótipos diferem em sua capacidade de manter a integridade da membrana na maturidade. Os autores confirmaram esses dados de acordo com estudos utilizando fluorescência celular, que revelaram diferenças na viabilidade celular do mesocarpo entre genótipos de uva (Krasnow et al., 2008; Tilbrook e Tyerman, 2008; Fuentes et al., 2010).



3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal avaliado

Para as avaliações foram usadas bagas de *V. labruscana*. (var. Niagara Rosada) e *V. vinifera* (var. Chardonnay), cultivadas em casa de vegetação no sistema de espaldeira, localizada no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, RJ.

As videiras estão cultivadas em vasos com capacidade para 25 L de solo, contendo como substrato uma mistura de Latossolo Vermelho-Escuro (LVE), distrófico, textura argilosa, esterco de curral e areia, na proporção 1:1:1, com adubações realizadas de acordo com análise de solo seguindo os protocolos para a cultura e mantido um controle de pragas e doenças sempre que necessário. O sistema de irrigação é por gotejamento, utilizando um gotejador PCJ (tipo botão) por vaso, com vazão de 4 L h⁻¹. O manejo da irrigação foi realizado com controle automático para manter o solo em capacidade de campo.

Para esse trabalho, a poda foi realizada no mês de março de 2021. Logo em seguida, foi aplicada solução de 5% cianamida hidrogenada (DORMEX®) nas gemas com auxílio de um pincel de cerdas finas, para uniformizar as brotações.

Os cachos de uva utilizados nas avaliações foram identificados individualmente com uma placa contendo informações como dias após antese (DAA) e *veraison*.

3.2. Análises qualitativas do desenvolvimento das bagas

As análises de diâmetro, sólidos solúveis totais e deformabilidade foram realizadas utilizando-se seis bagas por avaliação. As avaliações iniciaram com bagas aos 10 DAA até os 95 DAA.

3.2.1. Diâmetro e sólidos solúveis totais

As bagas tiveram seu diâmetro equatorial medido com o auxílio de paquímetro digital (Digimess®, Brasil). O suco de cada uma das bagas foi coletado individualmente



para avaliação de sólidos solúveis totais (SST), por refratometria, utilizando um refratômetro manual digital, com compensação de temperatura, modelo RHB-32 (Yhequipment Co., China).

3.2.2. Deformabilidade das bagas

A deformabilidade das bagas foi medida em 18, 20, 22, 40, 42, 44, 80, 82 e 84 DAA pelo ponto médio longitudinal do fruto, usando um texturômetro modelo *TA-XT Express* (Stable Micro Systems, USA), que exerce uma força constante gerada por uma mola. Esse método possibilitou o cálculo de deformação em bagas individuais a partir da força exercida sobre os frutos em resposta à diminuição do diâmetro causada pela força aplicada de 2,5 N por 5 s até promover a ruptura da baga.

3.3. Atividade enzimática da invertase ácida do mesocarpo

3.3.1. Obtenção do extrato enzimático

A fração solúvel e insolúvel vacúolo e parede celular foi obtida conforme Zhang et al. (2006), com modificações. O tampão de maceração foi composto por 150 mM Tris-HCl (pH 8,0); 2 mM EDTA; 10 mM MgCl₂; 0,2% (v/v) 2-mercaptoethanol; 0,1 mM fenilmetilsulfonil; 10 mM ácido ascórbico; 3% (p/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 1 mM benzamidina.

As bagas tiveram suas sementes e cascas retiradas e foram rapidamente maceradas com tampão de maceração gelado a 4°C, na proporção de 2:1 (p/v) até a obtenção de um extrato homogêneo. Em seguida o extrato foi filtrado em gaze (100% algodão em oito camadas), vertido em microtubos tipo Eppendorf com capacidade para 1,5 mL, e centrifugado em centrífuga (Mikro 220R, Germany) por 10 min, a 16.000g a 4°C. O sobrenadante foi usado para mensurar a atividade da invertase ácida vacuolar (IAV).

O pellet restante foi lavado 3x com o tampão de maceração (pH 4,5), sem PVPP, e centrifugado a 16.000g por 20 min, sendo o sobrenadante descartado. O pellet formado da centrifugação acima foi deixado durante a noite em banho seco com agitação de 300 RPM (Kasvi thermomixer modelo k80-120) em 4 ° C, com tampão de extração (pH 4,5) contendo 500 mM de NaCl a 4°C, sendo realizada então uma nova centrifugação de



16.000g por 20 min, sendo o sobrenadante usado para mensurar a invertase ácida de parede celular (IAPC), similarmente a IAV.

3.3.2. Determinação das atividades das invertases solúvel e insolúvel

As atividades das invertases foram mensuradas segundo Schaffer et al. (1987), com modificações. Foi necessário realizar uma curva padrão de glicose obtida por meio de soluções com concentrações variando de 100 mg L⁻¹ a 900 mg L⁻¹ de glicose.

As atividades foram mensuradas em 50 µL de 100 mM tampão acetato de sódio, pH 4,8, 40 µL de 100 mM sacarose e 10 µL de amostra de enzima em banho maria, a 35°C por 30 min. A reação foi paralisada com a adição do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) resfriado a 4°C e os açúcares redutores produzidos pela reação foram determinados de acordo com Miller (1959). As amostras foram lidas em leitor de microplacas µQuant (Biotek, UK) com o comprimento de onda a 540 nm. Uma unidade (U) de atividade de invertase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de grupos redutores, medidos como glicose por minuto, nas condições de reação utilizadas.

3.4. Coleta da seiva apoplástica e vacuolar

A coleta foi realizada conforme Keller e Shrestha (2014). Foram usadas quatro bagas de *V. labruscana*, em 57 e 95 DAA e *V. vinifera* em 54 e 93 DAA. A diferença em DAA é referente à diferença da data de florescimento dos cachos. As bagas foram inseridas com seus pedicelos em um tubo falcon com capacidade de 15 mL, em orifícios perfurados individualmente, com as bagas do lado de fora e os pedicelos para dentro do tubo. Os pedicelos foram selados com cola de vedação (Tekbond 793), conforme mostrado na Figura 5.



Figura 5: Coleta da seiva vacuolar por bomba de Scholander. O tubo de centrifugação contendo as bagas foi envolto por uma luva de plástico, fixada no *tip* de 1 mL. A ponta do *tip* foi inserida no orifício da tampa da bomba de Scholander para que o ar do sistema dentro da luva pudesse escapar. Arquivo pessoal.

Uma ponta de pipeta de plástico de 1 mL foi inserida através de um orifício perfurado no meio da tampa de rosca do tubo e selada no tubo com cola quente. O tubo foi envolvido por uma luva de plástico e levado para bomba de pressão tipo Scholander (Modelo 3000F01H12G2P40, Soilmoisture Equipment Corp, Estados Unidos da América) com a extremidade aberta e ponta da pipeta se projetando através do anel de vedação, para permitir o fluxo da seiva livre do pedicelo cortado (Figura 5).

Foi fornecida pressurização de 2 bar (0,2 MPa), por três minutos para coletar a seiva apoplástica. A seiva vacuolar foi extraída fazendo pressão na baga com as mãos, uma a uma até o rompimento da baga, após o rompimento a seiva foi coletada e transferida para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise.

3.5.1. Determinação da concentração de açúcares da baga

As amostras de ambas as frações, vacúolo e apoplasto foram centrifugadas em centrífuga (MIKRO 220, Germany) por 10 min a 4°C , a 9.300g e filtradas com membrana

de filtração de nitrato de celulose lisa de 0,45 μm .

Os açúcares foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) (Shimadzu, Japão), com dispersão de luz evaporativa (ELSD- LT II) à temperatura de 40°C, pressão de gás nitrogênio de 350 MPa, ganho de 9, configuração de filtro de 4 em uma coluna de HPLC de 5 μL (250 x 4.6 mm) e pré-coluna de Carboidrato Prevail ES (*Alltech Associates*, EUA) de 5 μL (7,5 x 4,6 mm).

O gradiente de corrida foi alcançado misturando proporções decrescentes de acetonitrila absoluta (Merck, Brasil) com água desionizada. O gradiente de acetonitrila teve a seguinte programação: 80% durante os primeiros 16 minutos, 80–70% entre 16 e 23 min e 70% de 23 a 30 minutos. O fluxo alcançou 1 mL min⁻¹ a 25°C. 5 μL de amostra foram injetadas e as áreas de pico e tempos de retenção foram medidas por comparação com quantidades conhecidas de padrões contendo sacarose, frutose e glicose (Sigma-Aldrich, USA).



4. RESULTADOS

O diâmetro das bagas foi medido durante o período de desenvolvimento após a antese (DAA), definido quando 50% das inflorescências encontram-se abertas. O crescimento em *V. vinifera* variou conforme o padrão característico de uma curva sigmoide dupla, com crescimento acentuado até os 22 DAA, no final da fase I (Figura 6). O *veraison*, na fase II, é considerado o “ponto de virada” de cor da baba, em que ela passa do estágio “verde” para o início da maturação. Nesta fase, a baba passou por grandes modificações em seu metabolismo para completar o amadurecimento. Além disso, ela ainda ganhou volume devido à entrada de água. O diâmetro máximo foi atingido, aproximadamente, aos 95 DAA, com valor médio de 15 mm. Em *V. labruscana*, o padrão de crescimento aparentou ser sigmoide simples. O crescimento da baba foi acentuado até os 20 DAA e estabilizou-se a partir da fase II.

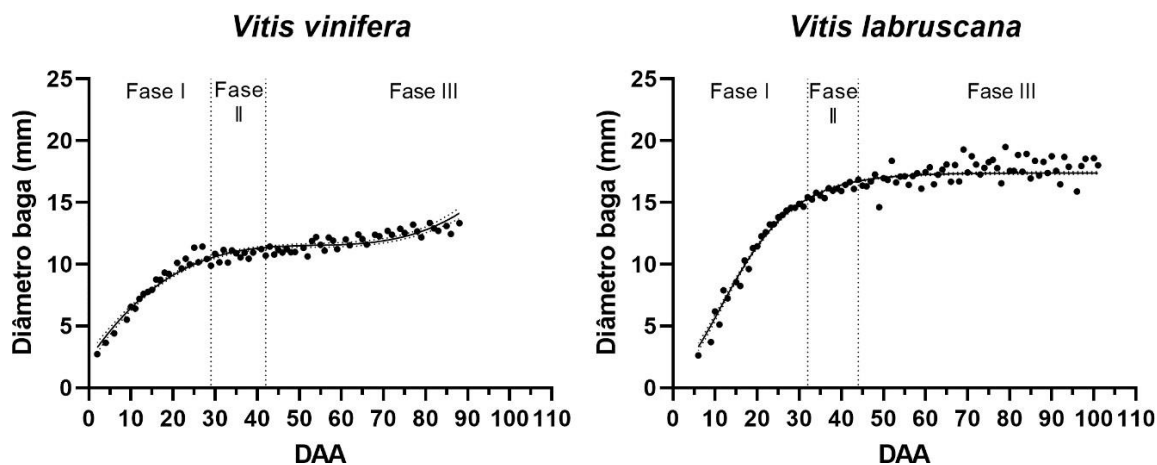


Figura 6: Variação do diâmetro da baga de *V. vinifera* var. Chardonnay e *V. labruscana* var. Niagara Rosada em diferentes fases de desenvolvimento. DAA significa dias após antese. A linha pontilhada representa a Fase II.

Durante o período de avaliação, notou-se que em *V. vinifera*, houve aumento no SST de 4° para 22° Brix, já em *V. labruscana*, o SST máximo atingido durante o amadurecimento completo foi 19° Brix (Figura 7). O acúmulo desses açúcares é parcialmente explicado pela alteração do metabolismo do fruto após o início da maturação (Ribereau-Gayon et al., 2003), visto que os açúcares redutores são utilizados como principal fonte de energia durante os estádios iniciais de desenvolvimento e, no período de maturação, o ácido málico passa a ser utilizado.

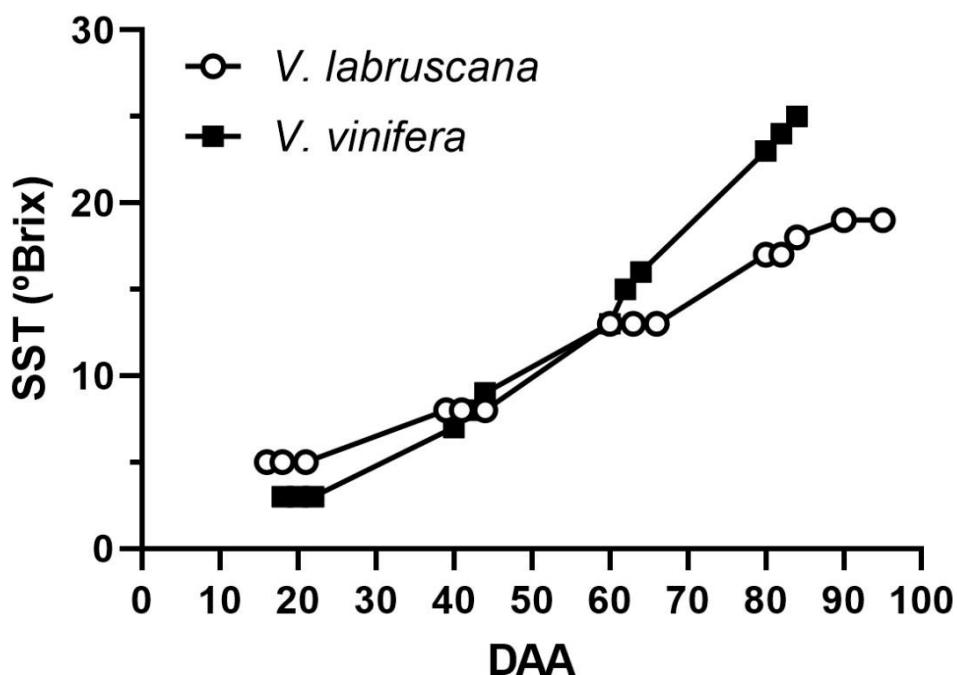


Figura 7: Sólidos solúveis totais (SST) de bagas *V. vinifera* var. Chardonnay e *V. labruscana* var. Niagara Rosada em diferentes fases do desenvolvimento. DAA significa dias após antese.

O amolecimento das bagas foi constatado ao longo do amadurecimento, pela redução da deformabilidade (N) nesta fase. A mudança na firmeza da baga foi observada em 42 DAA para *V. vinifera* e 44 DAA para *V. labruscana*, quando a força aplicada foi menor, contribuindo para a identificação do *veraison*.

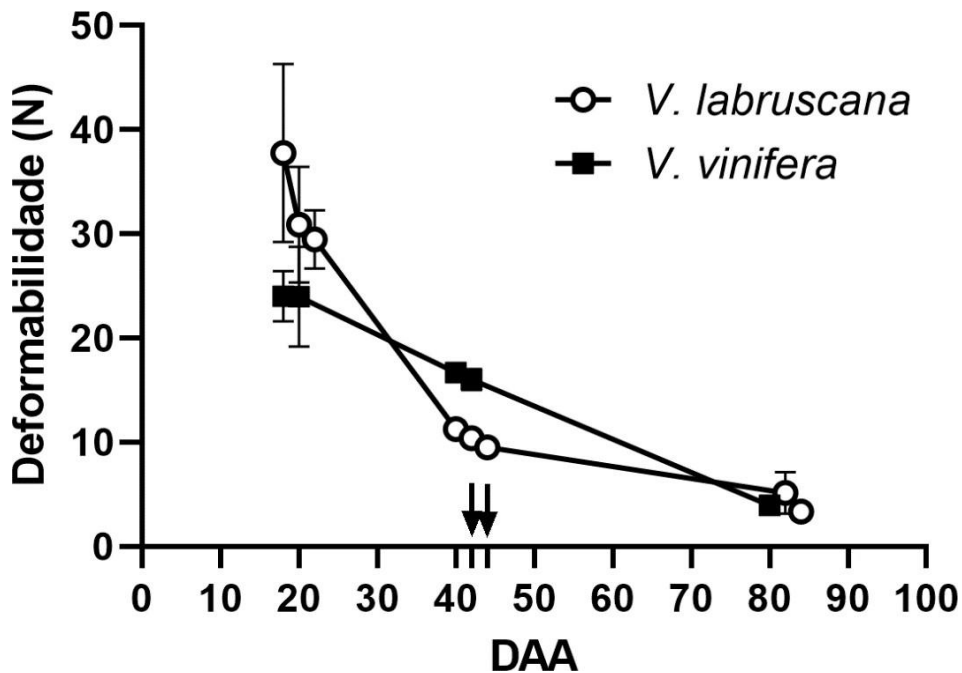


Figura 8: Deformabilidade de bagas de *V.vinifera* var. Chardonnay e *V. labruscana* var. Niagara Rosada durante desenvolvimento. DAA significa dias após antese. As setas representam o *veraison* de *V. vinifera* var. Chardonnay e *V. labruscanan* var. Niagara Rosada, respectivamente.

A atividade das invertases expressa o tipo de descarregamento de açúcares no floema. Para isso, foram avaliadas as duas isoformas da invertase ácida, a vacuolar solúvel (IAV) e a de parede celular (IAPC). A IAV hidrolisa a sacarose nos vacúolos, enquanto a IAPC hidrolisa a sacarose descarregada no apoplasto. Em *V. vinifera* var Chardonnay, a IAPC teve um ligeiro aumento após 60 DAA, enquanto a IAV teve brusco aumento em atividade no mesmo período. Já em *V. labruscana*, na fase III, a IAPC mostrou atividade enquanto a IAV reduzia a sua atividade. No final do amadurecimento (93 DAA), somente IAPC mostrou baixa atividade.

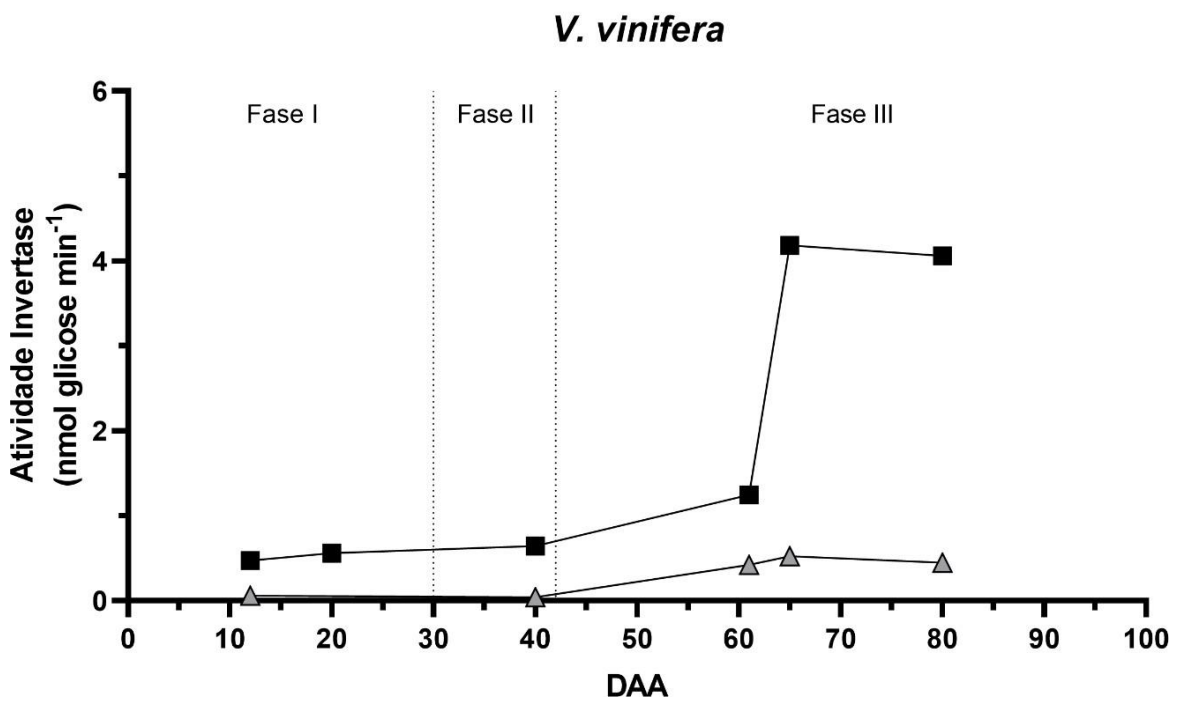
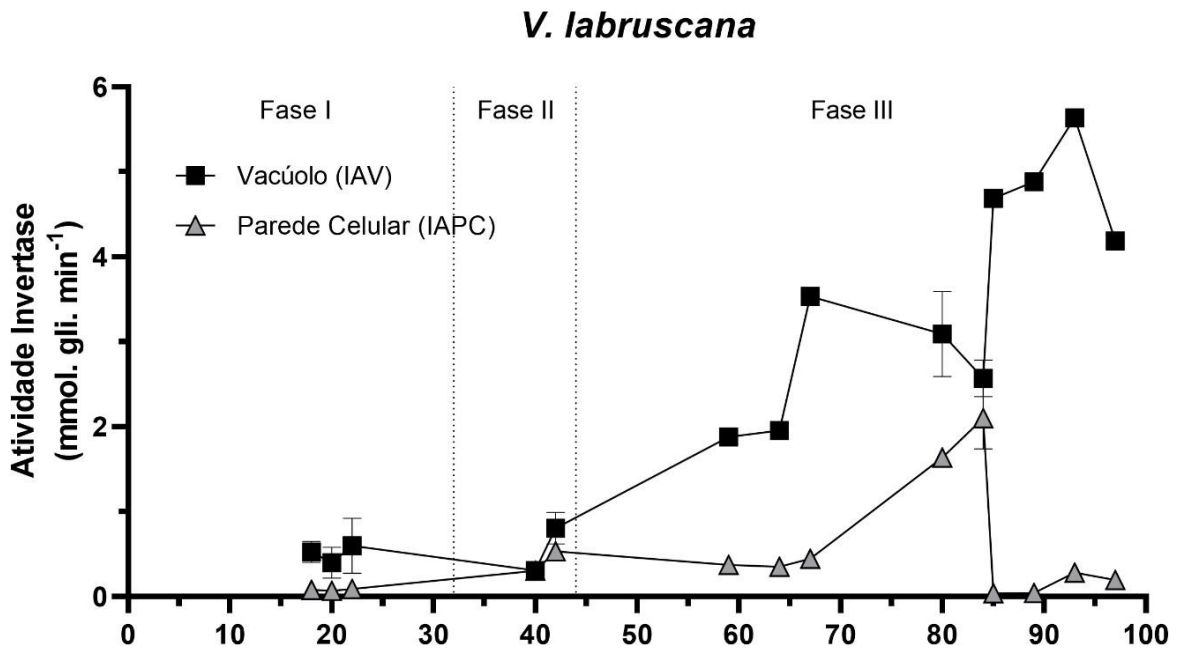


Figura 9: Atividade da invertase: Invertase ácida de parede celular (IAPC) e invertase ácida vacuolar (IAV) em bagas de *V. vinifera* var. Chardonnay e *V. labruscana* var. Niagara Rosada em diferentes fases do desenvolvimento. DAA significa dias após apanha.

[Handwritten signature]

As concentrações de açúcares solúveis, essencialmente glicose e frutose, variaram entre as duas variedades; em *V. labruscana*, os açúcares diminuíram acentuadamente em 95 DAA no vacúolo. Houve diminuição de 99,92% em 95 DAA em relação aos 57 DAA. Já no apoplasto, houve aumento de 394,35% em 95 DAA em relação aos 57 DAA. (b). Para *V. vinifera*, houve aumento nas concentrações de açúcares solúveis em 93 DAA, em ambos os compartimentos. O nível de sacarose, durante todas as fases de crescimento, para as duas variedades, apresentou pouca variação e níveis mais baixos, quando comparado aos açúcares redutores.

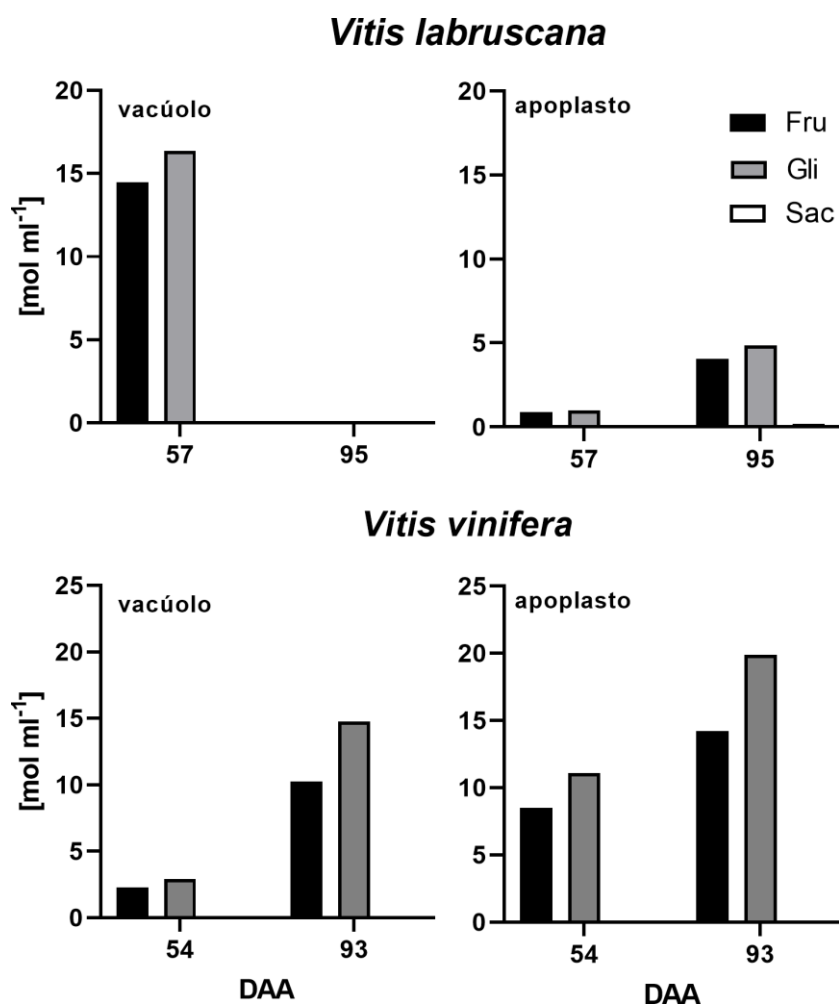


Figura 10: Teor de açúcares solúveis da seiva apoplástica e vacuolar em bagas *V. vinifera* var. Chardonnay e *V. labruscana* var. Niagara Rosada em diferentes fases do desenvolvimento. DAA significa dias após a antese.

5. DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram que em *V. labruscana* as concentrações de açúcares solúveis durante o amadurecimento acumularam somente no apoplasto, em 95 DAA. Diferentemente em *V. vinífera* em 93 DAA, os açúcares solúveis estão armazenados tanto no vacúolo quanto no apoplasto, o mesmo acontece em outras variedades de *V. vinífera*, conforme relatado por Keller e Shereta (2014).

Em *V. labruscana*, as invertases vacuolares que são responsáveis pelo descarregamento simplástico, ou seja, o descarregamento de açúcares ocorre para os vacúolos celulares, perdem atividade justamente quando a invertase de parede celular, que é responsável por descarregar os açúcares para o apoplasto, aumenta sua atividade, que até então mantinha-se em baixa atividade, e após, ambas perdem a atividade (Figura 9).

A invertase ácida de parede celular degrada a sacarose descarregada do floema diretamente para o apoplasto da baga, então as hexoses resultantes da quebra da sacarose são armazenadas no apoplasto (Zang, 2006). Em *V. vinífera*, a invertase vacuolar predominou em sua atividade sobre a invertase de parede celular e ambas as enzimas tiveram atividade reduzida no final do amadurecimento. Então há uma relação direta entre as vias de descarregamento do floema e o modo em que os açúcares são armazenados no vacúolo e apoplasto e essas mudanças variam de acordo com o genótipo.

As concentrações de açúcares solúveis, variaram entre *V. labruscana* e em *V. vinífera* (Figura 10). Glicose e frutose variaram em concentrações no apoplasto e no vacúolo, e a sacarose manteve-se em baixas concentrações. A razão pela qual a sacarose é encontrada em baixas concentrações na baga se deve à ação de invertases (Carroll e Marcy, 1982). Clarke e Rogiers (2019) mostraram que a perda da integridade celular pode prejudicar a capacidade da baga em obter e reter água e sobre o fluxo do floema. Em variedades viníferas, quando o floema tem perda de funcionalidade na fase



pós-*veraison*, o acúmulo de açúcares na baga é reduzido (Krasnow et al., 2008). Neste trabalho, observamos que em 95 DAA, em *V. labruscana*, não houve acúmulo de açúcares no vacúolo; estudos anteriores relataram que após o *veraison* (44 DAA), o fluxo do xilema da planta mãe para as bagas é interrompido ao mesmo tempo em que as bagas iniciam precocemente a perda da integridade celular e passam a exibir o mesocarpo com consistência gelatinosa e com cerca de 80 % das membranas celulares prejudicadas (Lerin, 2016; Baritiello, 2018). Ainda, assim, a baga permaneceu com capacidade de absorver água para manter seu crescimento, então, as mudanças fisiológicas percebidas em *V. labruscana* não são condizentes com a fase de senescência. Em Thompson Seedless (*V. vinifera*), a perda da integridade celular não é detectada (Tilbrook e Tyerman, 2008; 2009), e a baga permanece acumulando açúcares até o final do amadurecimento (Munõz-Robredo et al., 2011).

Em Chardonnay (*V. vinifera*), a viabilidade celular com marcação com FDA aos 100 DAA indicou que a perda de integridade celular ocorreu em 30% da área do mesocarpo (Tilbrook e Tyerman, 2008; Fuentes et al., 2010). Lang e Doring (1991) haviam sugerido que a perda de integridade das células do mesocarpo é um evento natural do desenvolvimento da baga no final do ciclo de amadurecimento, e isso explicaria a perda generalizada do conteúdo celular para o apoplasto, levando à perda da viabilidade celular, da firmeza e pressão de parede da célula.

Como já dito anteriormente, a glicose e a frutose são os açúcares dominantes na baga em termos de concentração (Hawker et al., 1976; Liu et al., 2006; Shiraishi et al., 2010). Há relatos que a concentração de açúcares varia de acordo com o ambiente, práticas de cultivo e variedade (Liu et al., 2007; Dai et al., 2011; Duchêne et al., 2012). Observamos que a concentração de SST foi próxima de 3° Brix no início do desenvolvimento (10 DAA) para ambas as variedades, e seguiu aumentando substancialmente durante o amadurecimento chegando ao grau máximo de 19° Brix em *V. labruscana*, e de 25 ° Brix em *V. vinifera*.

O amolecimento da baga marca o início do amadurecimento da baga e é rapidamente seguido pelo início do acúmulo de açúcar e expansão da baga (Figura 8), e pelo catabolismo do malato e acúmulo de antocianina em cultivares tintas (Hernández-



Montes et al., 2020). O fato do “amolecimento” dos frutos ter acontecido rapidamente, antes que qualquer açúcar fosse acumulado e antes que as bagas retomassem o crescimento, sugere que o “amolecimento” continua durante o amadurecimento (Hernández-Montes et al., 2020).



6. CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho, concluímos que o armazenamento de açúcares solúveis no final do amadurecimento de duas variedades de uvas (*V. vinífera* e *V. labruscana*), apresenta padrão diferencial sobre a forma como ocorre o acúmulo de açúcar. A via de descarregamento do floema altera o armazenamento dos açúcares solúveis; em *V. labruscana*, no final do amadurecimento, houve apenas açúcares acumulados no apoplasto. Em *V. vinífera*, houve aumento do acúmulo de açúcares, tanto no apoplasto como no vacúolo, portanto, o descarregamento do floema, no final do amadurecimento, tem influência direta sobre armazenamento dos açúcares e essas mudanças variam de acordo com a variedade.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayre, B. G. (2011). Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. *Molecular Plant* 4:377-394.
- Baritiello, L. (2018). Perda prematura de vitalidade celular em bagas de *Vitis labruscana* L. /Baritiello Luan. (2018). 57 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2018.
- Bondada, B. R., Matthews, M. A., Shackel, K. A. (2005). Functional xylem in the post-veraison grape berry. *Journal of Experimental Botany*, 56:2949-2957.
- Bradford, K. J. (1994). Water stress and the water relations of seed development: a critical review. *Crop Science*, 34:1-11.
- Bruce, D. M. (2003) Mathematical modelling of the cellular mechanics of plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358:1437–1444
- Camargo, U. A. Uva para Processamento. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CONT000g5f8c0u802wx5ok0bb4szwyx060i6.html >. Acesso em: 29 fev. 2022.
- Carpaneto, A., Geiger, D., Bamberg, E., Sauer, N., Fromm, J., Hedrich, R. (2005). Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *Journal of Biological Chemistry*. 280(22):21437-43.
- Carroll, D. E., Marcy, J. E., 1982. Chemical and physical changes during maturation of Muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). *American Journal of Enology and Viticulture*, 33:168-172.
- Chen, L. Q., Qu, X. Q., Hou, B. H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R. (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*, 335(6065):207-11.
- Choat, B., Gambetta, G. A., Shackel, K. A., Matthews, M. A. (2009). Vascular function in grape berries across development and its relevance to apparent hydraulic isolation. *Plant Physiology*, 15:1677–1687.
- Clarke, S. J., Rogiers, S. Y. (2019). The role of fruit exposure in the late season decline of grape berry mesocarp cell vitality. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135:69-76.
- Coombe, B. G. (1976). The development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology*, 27:20-228.
- Cuéllar, T., Azeem, F., Andrianteranagna, M., Pascaud, F., Verdeil, J. L., Sentenac, H., Gaillard, I. (2013). Potassium transport in developing fleshy fruits: the grapevine inward K⁺ channel VvK1.2 activated by CIPK-CBL complexes and induced in ripening berry flesh cells. *The Plant Journal*, 73:1006–1018.
- Dai, Z., Wu, H., Baldazzi, V., van Leeuwen, C., Bertin, N., Gautier, H., Wu, B., Duchêne, E., Gomès, E., Delrot, S., Lescourret, F., Génard, M. (2016). Inter-species comparative analysis of components of soluble sugar concentration in fleshy fruits. *Frontiers in Plant Science*, 7:649
- Davies, C. & Robinson, S. P. (1996). Sugar accumulation in grape berries (cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues). *Plant Physiology*, 111(1):275-283.



- Dražeta, L., Lang, A., Hall, A. J., Volz, R. K. & Jameson, P. E. (2004). Causes and effects of changes in xylem functionality in apple fruit. *Annals of Botany*, 93:275–282.
- Duchêne, E., Dumas, V., Jaegli, N., Merdinoglu, D. (2012). Deciphering the ability of different grapevine genotypes to accumulate sugar in berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18:319–328
- During, H., Lang, A. & Oggionni, F. (1987). Patterns of water flow in Riesling berries in relation to developmental changes in their xylem morphology. *Vitis*, 26:123–131.
- Findlay, N., Oliver, K. J., Nii, N. & Coombe, B. G. (1987). Solute accumulation by grape pericarp cells. IV. Perfusion of pericarp apoplast via the pedicel and evidence for xylem malfunction in ripening berries. *Journal of Experimental Botany*, 38:668–679.
- Fuentes, S., Sullivan, W., Tilbrook, J., Tyerman, S. D. (2010). A novel analysis of grapevine berry tissue demonstrates a variety-dependent correlation between tissue vitality and berry shrivel. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16:327-336.
- Greenspan, M. D., Schultz, H. R., Matthews, M. A. (1996). Field evaluation of water transport in grape berries during water deficits. *Physiologia Plantarum*, 97:55–62.
- Hardie, W. J., O'Brien, T. P., Jaudzems, V. G. (1996). Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2:97–142
- Hawker, J. S., Ruffner, H. P., Walker, R. R. (1976). The sucrose content of some Australian grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27:125–129.
- Hellmann, H., Barker, L., Funck, D., Frommer, W.B. (2000). The regulation of assimilate allocation and transport. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27:583-594.
- Hernández-Montes, E., Zhang, Y., Chang, B. M., Shcherbatyuk, N., Keller, M. (2020). *American Journal of Enology and Viticulture*, 72:137-151.
- Keller, M., Shrestha, P. M. (2014). Solute accumulation differs in the vacuoles and apoplast of ripening grape berries. *Planta*, 239:633–642.
- Keller, M. (2015). *The science of grapevines—anatomy and physiology* 2nd Ed., Academic Press, San Diego.
- Koblet, W. (1969). Wanderung von Assimilaten in Rebtrieben und Einfluss der Blattfläche auf Ertrag und Qualität der Trauben. *Wein-Wiss*, 24:277-319.
- Krasnow, M., Matthews, M. A., Shackel, K. A. (2008). Evidence for substantial maintenance of membrane integrity and cell viability in normally developing grape (*Vitis vinifera* L.) berries throughout development. *Journal of Experimental Botany*, 59:849-859
- Lalonde, S., Tegeder, M., Throne-Holst, M., Frommer, W. B., Patrick, J. W. (2003). Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell & Environment*, 26:37-56
- Lalonde, S., Wipf, D., Frommer, W. B. (2004). Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology*, 55:341-372.



- Lang, A., Düring, H. (1991). Partitioning control by water potential gradient: evidence for compartmentation breakdown in grape berries. *Journal of Experimental Botany*, 2(9):1117-1122.
- Lang, A., Thorpe, M. R. (1989). Xylem, phloem and transpiration flows in a grape: application of a technique for measuring the volume of attached fruits to high resolution using Archimedes' principle. *Journal of Experimental Botany*, 40:1069-1078.
- Lerin, J. (2016) Propriedades hidráulicas em bagas em desenvolvimento de *Vitis labruscana* L. Cv. Niagara Rosada: relação entre vitalidade do mesocarpo e funcionalidade do xilema / Joviana Lerin. – Campos dos Goytacazes, 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes.
- Liu, H., Wu, B., Fan, P., Xu, Li. S. (2006). Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:1526–1536.
- Ma, S., Li, Y., Xin, Li., Sui, X., Zhang, Z. (2018). Phloem unloading strategies and mechanisms in crop fruits. *Journal of Plant Growth Regulation*, 10:1–7.
- Metzner, R., Thorpe, M. R., Breuer, U., Blumler, P., Schurr, U., Schneider, H. U. (2010). Contrasting dynamics of water and mineral nutrients in stems shown by stable isotope tracers and cryo- SIMS. *Plant, Cell & Environment*, 33:1393-1407.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31:426-428
- Moura, M. F., Hernandez, J. L., Júnior, M. P. (2021). Uvas de interesse econômico para vinificação e consumo in natura. *Revista Visão Agrícola*, 14:8-19.
- Munch, E. (1930). *Stoffbewegungen in der Pflanze*, Alemanha.
- Muñoz-Robredo, P., Robledo, P., Manríquez, D., Molina, R., Defilippi, B. G. (2011). Characterization of sugars and organic acids in commercial varieties of table grapes. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71:452–458.
- Patrick, J. W. (1997). Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:191-222.
- Peuke, A. D. (2010). Correlations in concentrations, xylem and phloem flows, and partitioning of elements and ions in intact plants. A summary and statistical re-evaluation of modelling experiments in *Ricinus communis*. *Journal of Experimental Botany*, 61:635-655.
- Peuke, A. D, Rokitta, M., Zimmermann, U., Schreiber, L., Haase, A. (2001). Simultaneous measurement of water flow velocity and solute transport in xylem and phloem of adult plants of *Ricinus communis* over a daily time course by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Plant, Cell & Environment*, 24:491-503
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2003). *Tratado de Enología: Microbiología del vino, vinificaciones*. 1 Ed., Hemisfério Sur, Buenos Aires.
- Rogiers, S. Y., Hatfield, J. M., Jaudzems, V. G., White, R. G. and Keller, M. (2004). Grape berry cv. Shiraz epicuticular wax and transpiration during ripening and preharvest weight loss. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55:121-127.
- Rogiers, S. Y., Smith, J. S., White, R., Keller, M., Holzappel, B. P., Virgona, J. M. (2001). Vascular function in berries of *Vitis vinifera* (L) cv Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine*

Research, 7:47-51.

- Sauer N. (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters*, 581: 2309–2317
- Schaffer, A. A., Sagee, O., Goldschmidt, E. E., Goren, R. (1987). Invertase and sucrose synthase activity, carbohydrate status and endogenous IAA levels during citrus leaf development. *Physiologia Plantarum*, 69:151–155
- Schulz, A. (2005). Role of plasmodesmata in solute loading and unloading. In KJ Oparka, ed, *Plasmodesmata*, Annual Plant Reviews online, 135–161.
- Shiraishi, M., Fujishima, H., Chijiwa, H. (2010). Evaluation of table grape genetic resources for sugar, organic acid, and amino acid composition of berries. *Euphytica*, 174:1-13.
- Stommel, J. R. (1992). Enzymic components of sucrose accumulation in the wild tomato species *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Physiology*, 99:324-328.
- Swanson, C. A., Elshishiny, E. D. H. (1958). Translocation of sugars in the Concord grape. *Plant Physiology*, 33:33-37.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., Murphy, A. (2016). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Editora Artmed.
- Thomas, T. R., Shackel, K. A., Matthews, M. A. (2008). Mesocarp cell turgor in *Vitis vinifera* L. berries throughout development and its relation to firmness, growth, and the onset of ripening. *Planta*, 228:1067–1076.
- Thompson, M. V., Holbrook, N. M. (2004). Scaling phloem transport: information transmission. *Plant, Cell & Environment*, 27:509–519
- Tilbrook, J., Tyerman, S. D. (2009). Hydraulic connection of grape berries to the vine: varietal differences in water conductance into and out of berries, and potential for backflow. *Functional Plant Biology*, 36(6):541-550.
- Tilbrook, J., Tyerman, S. D. (2008). Cell death in grape berries: varietal differences linked to xylem pressure and berry weight loss. *Functional Plant Biology*, 35:173-184
- Tyerman, S. D., Tilbrook, J., Pardo, C., Kotula, L., Sullivan, W., Steudle, E. (2004). Direct measurement of hydraulic properties in developing berries of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz and Chardonnay. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10:170-181.
- Van Bel, A. J. E. (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment*, 26:125-149.
- Windt, C. W., Vergeldt, F. J., Jager, P. A., Van As, H. (2006). MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato, and tobacco. *Plant, Cell & Environment*, 29:1715-1729.
- Yelle, S., Chetelat, R. T., Dorais, M., DeVerna, J. W., Bennett, A. B. (1991). Sink metabolism in tomato fruit. IV genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. *Plant Physiology*, 95(4):1026-1035
- Yinshan, G., Zaozhu, N., Kai, S., Jia, Z., Zhihua, R., Yuhui, Z. (2017). Composition and content analysis of sugars and organic acids for 45 grape cultivars from northeast region of China. *Pakistan Journal of Botany*, 49:155-160.
- Zhang, K. J. Y., Markus, K. (2017). Discharge of surplus phloem water may be required for normal

grape ripening. *Journal of Experimental Botany*, 68(3):585-595.

Zhang, X. Y., Wang, X. L., Wang, X. F., Xia, G. H., Pan, Q. H., Fan, R. C., Wu, F. Q., Yu, X. C., Zhang, D. P. (2006). A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiology*, 142:220-232.

