

ANA LÚCIA LEITE MORAES

PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DO PESSEGEIRO (*Prunus persica* (L)  
Batsch cv.Biuti): MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO ATAQUE DE  
*Monilinia fructicola*

Dissertação apresentada à Escola Superior  
de Agricultura de Lavras, como parte das  
exigências do Curso de Mestrado em  
Ciências dos Alimentos, para obtenção do  
grau de "Magister Scientiae".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS  
LAVRAS - MINAS GERAIS  
1992

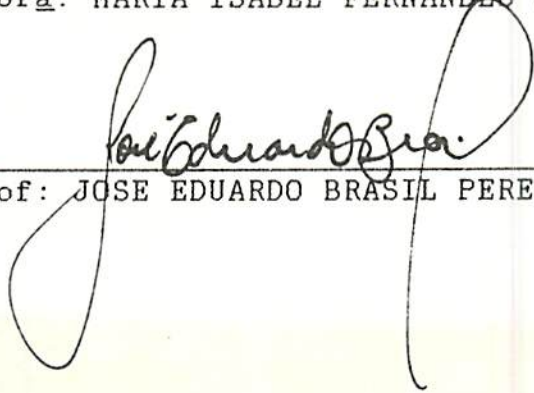


POS-COLHEITA DE FRUTOS DO PESSEGUEIRO (*Prunus persica* (L) Batsch  
cv. Biuti): MECANISMOS DE RESISTENCIA AO ATAQUE DE  
*Monilinea fructicola*.

Aprovada: 17 / 12 / 92

  
Prof.: ADMILSON BOSCO CHITARRA

  
Prof<sup>a</sup>: MARIA ISABEL FERNANDES CHITARRA

  
Prof.: JOSE EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO

## DEDICATORIA

Aos meus pais Luiz e Madalena,  
aos meus irmãos Luiz Marcos e Plinio,  
a minha cunhada Regina, pelo amor,  
compreensão e estímulos recebidos  
durante esta jornada.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida...

A Escola Superior de Agricultura de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Admilson Bosco Chitarra pela orientação e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos professores, Maria Izabel Fernandes Chitarra, Manoel Lousada Gavilanis, José da Cruz Machado e José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelas sugestões e apoio.

Aos funcionários Mércia Guimarães, Eloisa Aparecida Leite e Tales Giarola pela amizade e colaboração nas análises.

Aos funcionários da EPAMIG e Biblioteca Central pela delicadeza, atenção e apoio técnico.

A Cristina e Déborah pelas sugestões, colaboração e amizade.

Aos meus amigos Nély, Gilmarcos, Aloisio, Luiz Carlos, Cláudia, Kátia, Alexandra e Dalton pelo apoio, convívio e amizade.

A professora Yolanda pelo apoio e amizade.

Ao Paulo Sérgio por tudo.

Ao Luiz Roberto pela atenção dispensada no trabalho de digitação.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA DA AUTORA

ANA LUCIA LEITE MORAES, filha de Luiz Gonzaga de Moraes e Maria Madalena Leite Moraes, nasceu em Itau de Minas, MG, a 1 de abril de 1967.

Graduada em Farmácia-Bioquímica pela Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - EFOA, em dezembro de 1987.

Especialista em Microbiologia pela Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - EFOA, em março de 1989.

Iniciou o curso de mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração Fisiologia Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças na Escola Superior de Agricultura de Lavras, em agosto de 1989.

Atualmente, professora de Bioquímica e Tecnologia de Produtos Agropecuários da Universidade de Alfenas - UNIFENAS.

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>04</b>
2.1. A parede celular.....	06
2.2. Interação hospedeiro-patógeno.....	09
2.3. Alteração na parede celular devido a formação de periderme em ferimento, relacionada com a resistência a doenças.....	12
2.4. O envolvimento da parede celular no processo infeccioso.....	19
2.5. A habilidade universal do patógeno de plantas para produzir enzimas que degradam polissacarídeos.....	20
2.6. Controle ambiental da produção das enzimas degradadoras de polissacarídeos pelos patógenos de plantas.....	22
2.7. Especificidade dos polissacarídeos pelas enzimas degradadoras.....	25
2.8. Evidência direta do envolvimento dos polissacarídeos da parede celular e das enzimas degradadoras de polissacarídeos na resistência às doenças.....	27
<b>3. MATERIAL E METODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1. Procedência do material.....	35
3.2. Coleta e preparo das amostras.....	35

3.3. Instalação dos experimentos.....	36
3.4. Caracterização dos frutos.....	37
3.5. Técnica do ferimento mecânico e período de cura.....	38
3.6. Estudo da resistência dos frutos a <i>Monilinea fructicola</i> .....	40
3.6.1. Fonte de inóculo e técnica de isolamento.....	40
3.6.2. Preparo da suspensão de esporos e inoculação dos frutos.....	41
3.7. Obtenção e análise dos discos de tecido dos frutos....	42
3.7.1. Obtenção dos discos.....	42
3.7.2. Análises histoquímicas.....	42
3.7.3. Análises químicas.....	44
3.8. Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1. Ensaio histoquímico.....	47
4.2. Resistência.....	56
4.3. Açúcares neutros da parede celular.....	60
5. CONCLUSÕES.....	66
6. RESUMO.....	67
7. SUMMARY.....	69
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
Apêndice.....	88

## LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
1 - Valores médios dos componentes físicos, químicos e físico-químicos da cultivar de pêssego 'Biuti'.....	48
2 - Reações de coloração da parede celular de tecidos de pêssego 'Biuti' submetidos a diferentes tempos de cura de ferimento mecânico, sem e com posterior inoculação com suspensão de esporos de <u>Monilina fructicola</u> .....	49
3 - Composição dos açúcares neutros (mg/100mg de parede celular) da parede celular de pêssego 'Biuti' sem injúria (S/I) e com injúria (C/I), mantidos por 72 horas a 20 C e 75% de U.R.....	61

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
1 - Estilete utilizado para injuriar mecanicamente os frutos.....	39
2 - Perfurador utilizado para retirar os discos de tecidos dos frutos.....	39
3 - Esquema de pêssego representando os tecidos e a profundidade da injúria.....	39
4 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssego pela coloração Nitroso teste: a) tecidos sem injúria (controle); b) tecidos após 48 horas de cura de ferimento (Experimento 2, Grupo 3) 1 dia após a inoculação com suspensão de esporos de <u>Monilinea fructicola</u> ; indicando: I - Substancias fenólicas, II - Cuticula. Aumento de 200x.....	51
5 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssego pela coloração Azul de Astra: a) tecidos sem injúria; b) tecidos com injúria após 72 horas de cura; indicando: I - Mistura de fenólicos, II - Parede celular não lignificada, III - Elementos lignificados. Aumento de 200x.....	54

- 5A - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssego pela coloração Azul de Astra: c) tecido após 72 horas de cura de ferimento (Experimento 2, Grupo 3) 2 dias após a inoculação com suspensão de esporos de Monilinea fructicola; indicando: I - Mistura de fenólicos. Aumento de 200x.... 55
- 6 - Resistência do pêssego, cultivar 'Biuti' ao ataque de Monilinea fructicola submetido à cura de ferimentos por diferentes tempos à 20 C e UR 75-80%..... 57
- 7 - Histograma dos açúcares neutros em discos de pêssego 'Biuti', injuriado mecanicamente ou não após 0, 24, 48 e 72 horas de cura. (\* diferente por Tukey 5%)..... 65
- 8 - Equação e curva de regressão de rhamnose em discos de tecidos de pêssego 'Biuti' injuriados mecanicamente em função do tempo de cura..... 89
- 9 - Equação e curva de regressão dos valores médios de fucose em discos de tecidos de pêssego 'Biuti' injuriados e não injuriados em função do tempo de cura..... 89
- 10 - Equação e curva de regressão dos valores médios de arabinose em discos de tecidos de pêssego 'Biuti' injuriados e não injuriados em função do tempo de cura..... 90
- 11 - Equação e curva de regressão dos valores médios de xilose em discos de tecidos de pêssego 'Biuti' injuriados e não injuriados em função do tempo de cura..... 90



- 12 - Equação e curva de regressão de manose em discos de tecidos de pêssego 'Biuti' injuriados mecanicamente em função do tempo de cura..... 91
- 13 - Equações e curvas de regressão de galactose em discos de tecidos de pêssego 'Biuti' em função do tempo de cura. A) ( ) injuriados mecanicamente, B) (----) sem injúria..... 91
- 14 - Equação e curva de regressão dos valores médios de glicose em discos de tecidos de pêssego 'Biuti' injuriados e não injuriados em função do tempo de cura..... 92



## 1. INTRODUÇÃO

O pessegueiro por ser uma cultura de clima temperado, apresenta grandes áreas apropriadas à sua cultura, nas regiões sul e sudeste do Brasil, sendo que em Minas Gerais, existem microclimas característicos com potencial para a exploração das fruteiras de clima temperado, sobressaindo-se nestas circunstâncias, a região sul e a zona da mata do Estado, FERREIRA (1976). Além das condições climáticas favoráveis à produção de frutas de clima temperado, Minas Gerais e São Paulo, apresentam uma vantagem adicional da precocidade de colheita em relação às outras regiões brasileiras e do hemisfério sul. O Brasil ocupa o 11<sup>o</sup> lugar entre os países produtores do mundo e o 3<sup>o</sup> da América do Sul, FAO (1987).

Apesar da produção nacional de pessegos ter crescido bastante nos últimos anos em resposta ao desenvolvimento tecnológico e ao mercado externo com boas perspectivas, a falta de conservação adequada tem ocasionado perdas enormes ao fruticultor, agravando ao consumidor pela escassez e pela

elevação do preço.

Índices estatísticos, baseados em dados mundiais, revelam que no Brasil, cerca de 40% da produção é perdida por falta de armazenamento adequado para frutos e hortaliças, SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (1983).

O ataque por microrganismos é provavelmente a causa mais séria de perdas pós-colheita de produtos perecíveis, reduzindo a qualidade dos mesmos. As perdas pós-colheita são importantes tanto do ponto de vista econômico como nutricional, constituindo um problema tecnológico e cientificamente complexo, BOOTH & BURDEN (1968).

Nas condições climáticas em que são realizadas as colheitas de pêssego no Brasil, a deterioração é bastante rápida devido a maturação acelerada, exigindo uma série de cuidados para evitar perdas provocadas pelo manuseio e acondicionamento, CEASA (1962).

Diversas podridões afetam os frutos maduros durante o transporte e o armazenamento, principalmente devido aos fungos Monilinia fruticola (podridão parda), Glomerella cingulata (antracnose), Aspergillus niger (podridão negra), Botrytis cinerea (podridão cinza), Diplodia sp e Rhizopus sp., SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (1983).

A capacidade de formação de uma barreira de ferida é fator fundamental na caracterização de cultivares potencialmente resistentes às podridões que afetam os frutos pós-colheita.

É necessário, portanto, identificar essa habilidade nas diversas variedades e os tipos de mecanismos que promovem essa resistência para que, além da diminuição das perdas pos-

colheita, possibilite também subsídios para posteriores trabalhos de melhoramento genético em pessegueiros associando as características comerciais desejáveis do fruto à resistência às doenças.

Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo geral, caracterizar a resistência pós-colheita da cultivar 'Biuti' à podridão parda, através do estudo histoquímico e químico dos tecidos inoculados.

Como objetivos específicos para análise do grau de resistência da cultivar estudada, foram propostos:

1) identificar, através de estudo histoquímico, as modificações ocorridas nos constituintes da parede celular;

2) verificar os mecanismos de defesa desenvolvidos pela injúria e possíveis mecanismos adicionais de defesa pelo contato direto com o patógeno.

3) determinar as modificações ocorridas nos açúcares neutros da parede celular em resposta à cura de fermento.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O pêssego é um fruto que além de ser consumido "in natura" tem grande importância na industrialização, com destaque para a indústria de conserva.

Do ponto de vista fisiológico, o fruto pode ser definido como uma estrutura que resulta do desenvolvimento do tecido que suporta o óvulo da planta, sendo sua vida iniciada com a fertilidade, seguido pela fase de crescimento, maturidade, amadurecimento e senescência, MELFORD & PRAKASH (1986).

Embora resistentes durante o período de desenvolvimento na planta, quando maduros, os frutos apresentam susceptibilidade ao ataque de diversos microrganismos. Entretanto, para cada cultivar de frutos e hortaliças, somente um grupo relativamente pequeno de fungos parasitas e, possivelmente, de bactérias, tem requisitos nutricionais e capacidade enzimática que possibilitam o seu desenvolvimento extensivo nos tecidos do hospedeiro, FRIEND (1977). São patógenos típicos desse grupo Monilinea fructicola que causa podridão marrom em pêssegos, cerejas, maçãs e pêras, não produzindo a doença em frutos tropicais. Ainda nesse grupo

podem ser citados Penicillium digitatum e Penicillium italicum que causam doenças pós-colheita em frutos cítricos, enquanto o Penicillium expansum, é um sério patógeno de maçãs e pêras, e não ataca os frutos cítricos, ECKERT (1977).

Os processos de manipulação durante a pós-colheita envolvem diferentes etapas nas quais os frutos ficam sujeitos a uma série de injúrias. O tecido danificado é susceptível a infecções por microrganismos patogênicos além do aparecimento de cicatrizes visíveis que prejudicam a aparência dos frutos, tornando-os inaceitáveis no mercado, GOLOMB et alii (1984).

Informações precisas à respeito da resposta aos ferimentos pelas plantas são importantes para elucidar os processos de desenvolvimento de muitas doenças, uma vez que várias delas são resultantes da penetração do patógeno via ferimento. Tais informações certamente revelarão oportunidade para inovar medidas de controle baseadas na modificação da resposta do hospedeiro, BOSTOCK & STERMER (1989).

Ultimamente tem-se usado análises bioquímicas e histológicas para discernir mais precisamente a natureza da anatomia da ferida associada com resistência aos patógenos.

A resposta de células à penetração de fungos tem muito em comum com outros tipos de respostas à ferimentos físicos, químicos e a hipertonicidade. O estímulo traumático produz direta ou indiretamente uma cadeia de fenômenos bastante heterogêneos, os quais, no início, envolvem um grande número de mudanças visíveis nos tecidos próximos à superfície ferida, indicando não só a retomada da atividade metabólica mas também processos com um

definido caráter necrobiótico, BROWN (1978).

### 2.1.A parede celular

A parede celular é uma estrutura bastante resistente que envolve o plasmalema das células vegetais. Biologicamente esta estrutura é importante porque determina a morfologia e de alguma forma, a função da célula. Além disso, é também o envoltório limitante da célula, podendo estar diretamente envolvida na expansão celular, GOODWIN & MERCER (1983).

Quimicamente a principal característica das paredes celulares de todas as células é a rede de agregados organizados de moléculas de celulose, referidas como microfibrilas, embebidas em uma matriz de polissacarídeos não celulósicos e ligninas, ESKIN (1979).

Paredes celulares, primária e secundária, possuem o mesmo tipo de polissacarídeos: celulose, hemicelulose, e pectina, mas a proporção de cada um é muito diferente entre paredes primárias e secundárias. Além disso, a composição é bem diferente, uma vez que as paredes secundárias também possuem outros tipos de polímeros como as ligninas. A composição de cada tipo de polissacarídeo depende da espécie, variedade e outros fatores incluindo condições ambientais durante a vida da planta, MORRISON (1988).

A celulose é composta de longas cadeias de D-glicopiranosose com ligações beta-1,4 contendo unidades repetidas de celobiose. As cadeias individuais de glucanas são mantidas juntas as fibras



por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas no carbono 6 e os oxigênios glicosídeos das cadeias adjacentes, DELMER (1987); BRETT & WALDRON (1990).

Devido a sua estrutura a celulose é insolúvel em todos os solventes, exceto aqueles que causam hidrólise das ligações glicosídicas entre os resíduos ou que quebrem as ligações de hidrogênio entre as cadeias, DELMER (1987).

As substâncias pécticas consistem de uma mistura de três polissacarídeos: as galactanas, as arabanos e as ramnogalacturonas, ESKIN (1979).

As galactanas são longas unidades lineares de polímeros de D-galactopiranosose com ligação beta-1,4, enquanto as arabanos são polissacarídeos de baixo peso molecular formado de resíduos de L-arabofuranose, algumas das quais têm ligação alfa-1,5 e algumas com ligação alfa-1,3, ESKIN (1979).

O polissacarídeo predominante das substâncias pécticas são as ramnogalacturonas, um polímero de alto peso molecular composto de um esqueleto de resíduos de D-galacturonopiranosose intercalada com moléculas de ramnopiranosose com ligações alfa-1,2, ESKIN (1979).

As substâncias pécticas são solúveis em água, agente quelantes ou em ácidos diluídos, ERICKSON & ELBEIN (1980).

As hemiceluloses são definidas como polissacarídeos solúveis em substâncias alcalinas que são muito associadas com celulose. Na maior parte as hemiceluloses são compostas de D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, D-arabinose, reunidas em diferentes combinações e em várias ligações glicosídicas. Podem

também conter ácidos glicurônicos ou talvez outros ácidos urônicos, LAMPORT (1970) e ERICSON & ELBEIN (1980).

As hemiceluloses podem ser separadas em duas frações designadas A e B. A hemicelulose A é insolúvel em água e precipita quando o extrato alcalino é neutralizado em pH 5,0 com ácido acético. A hemicelulose B permanece no líquido sobrenadante sob neutralização sendo precipitada com a adição de etanol. A distinção estrutural entre essas duas frações não é bem clara, embora a B possa conter uma proporção maior de ácidos urônicos que a hemicelulose A. A maioria dos ácidos urônicos presentes na hemicelulose é o ácido 4-O-metil-D-glicurônico, ERICSON & ELBEIN (1980).

Elas são importantes constituintes das paredes primárias e secundárias e parecem ligar as cadeias pecticas e celulósicas. São compostas de três importantes grupos de polissacarídeos: as xilanas, as mananas e glicomananas e as galactanas e arabinogalactanas, ESKIN (1979).

**A - Xilanas:** são largamente distribuídas nas plantas superiores e consistem de polímeros de cadeias de xilopirranose. As xiloses são caracterizadas pelas suas cadeias laterais, tais como arabinofuranose com ligação beta-1,3 em milho e trigo e ácido glicurônico também com ligação beta-1,3. Alguns autores sugerem redefinir as hemiceluloses como aqueles polissacarídeos das plantas que não estão ligados covalentemente a celulose, ESKIN (1979).

**B - Mananas e Glicomananas:** estes polímeros são derivados de unidades de manopirranose e glicopirranose com ligação beta-1,4 com várias porções de glicose e manose. A razão de glicose e manose é



variada e depende da fonte, ESKIN (1979).

**C - Galactanas e Arabinogalactanas:** são altamente ramificadas de polímeros de D-galactopiranosose com ligações 1,3 e 1,6 com cadeias laterais de arabinose. A maioria da arabinose está presente na forma de um dissacarídeo (3-O-L-arabopiranosilarabofuranose) ligada via carbono 6 a cadeia de galactopiranosose. As galactanas, embora não livre de arabinose, é ainda referida com esse nome pois a maior porção dos resíduos são de galactose. Entretanto se grandes quantidades de L-arabinose estão presentes, este polímero é referido como arabinogalactanas, ESKIN (1979).

## 2.2. Interação hospedeiro-patógeno

Investigações anteriores sobre a patogenicidade e simbiose sugeriram uma associação entre a presença de componentes tóxicos e a extensão do desenvolvimento do fungo no tecido vegetal, AIST (1976).

O acúmulo de polifenóis, incluindo flavonóides, ácido cinâmico, e derivados, e coumarinas em tecidos imediatamente adjacentes a tecidos injuriados em muitos tipos de materiais de plantas, é considerado geralmente como dependente da interação tecido vivo e fungo, CONDON & KUC (1960).

Os mecanismos de resistência à doença podem ser divididos em duas categorias. A primeira inclui a produção, pelo vegetal, de substâncias antimicrobianas e substâncias inibidoras da síntese das enzimas degradantes da parede celular produzidas pelos

patógenos. Essas substâncias estão presentes nas plantas, antes da inoculação, no estado livre ou combinado. A outra está relacionada com a síntese, pelo vegetal, de substâncias antimicrobianas a infecção pelo patógeno ou modificações químicas nas suas células de forma que o ataque fúngico seja restrito ao menor espaço de tempo possível, FRIEND (1977).

Um dos importantes mecanismos de defesa nos vegetais é a chamada resposta hipersensitiva de resistência, na qual um pequeno número de células morre quando o vegetal é exposto à raça de microrganismos não patogênicos ou, a uma raça patogênica a qual seja resistente, DARVILL & ALBERSHEIN (1984). A morte do fungo seria, então, causada pela restrição do suprimento de nutrientes e também pela produção de metabólitos fungitóxicos, FRIEND (1977). HEATH (1976), após estudos sobre a resistência de gramíneas à ferrugem, concluiu que a hipersensibilidade é um fenômeno complexo, e que nesse caso específico, pode funcionar como um fator primário na restrição do crescimento fúngico, ou ser apenas resultante de várias interações preliminares entre a planta e seu patógeno potencial.

Os compostos de ação antimicrobiana resultantes da interação hospedeiro-patógeno, são as fitoalexinas. São compostos de baixo peso molecular sintetizados e acumulados em vegetais após exposição ao ataque de microrganismos, podendo também ser produzidas como resposta a estímulos abióticos, tais como injúria mecânica. Pelo fato das fitoalexinas não estarem presentes em plantas sadias e se acumularem no local da infecção microbiana, são relacionadas com a função de defesa do organismo vegetal, DARVILL & ALBERSHEIN (1984). KUC (1972), observou que cenouras



produziram isocumarina e ácido clorogênico em resposta ao ataque C. fimbriata. Relatou também que as duas fitoalexinas em combinação, eram mais efetivas que cada uma delas isoladamente (efeito sinérgico).

Os taninos foram um dos primeiros componentes fenólicos a atrair a atenção, como substâncias envolvidas na proteção de plantas após infecção.

As cortiças de muitas plantas contêm taninos e outros complexos de polifenóis. Os componentes fenólicos variam largamente em sua toxicidade. Os flavonóides quercitina, robinetina e catequina não foram tóxicos ao G. perennans, Hulme & Edney citados por CRUICKSHANK (1964). Os mesmos autores mostraram entretanto, que a germinação desse fungo era inibida por antocianinas, delfinidinas, perlargonidinas, petunidinas e cianidina.

Ferimentos nos alburnos das árvores frequentemente estimulam a síntese de materiais fenólicos. Após injúria do alburno de Eucalyptus maculata, os níveis de fenóis antimicrobiais aumentaram nas bordas dos tecidos feridos e saudáveis, MIREKU & WILKES (1988). Há também um aumento concomitante nas atividades de enzimas peroxidases oxidantes do fenol, tirosinase e lacase. A oxidação de fenóis simples à quinonas mais tóxicas e radicais livres de fenóis propicia um ambiente antimicrobiano.

Mudanças na biossíntese de fenóis após o ferimento em tubérculos de batata tem sido examinadas detalhadamente. Durante as primeiras 24 horas após a preparação de discos de tubérculos, existe um aumento nas enzimas da rota central da biossíntese de

fenilpropanóides em geral, FAL (Fenilalanina amônia liase), ácido cinâmico 4-hidroxilases e p-cumarato: CoA Ligase, LAMB (1982). O nível de ácido clorogênico aumenta em tecidos de tubérculos feridos após várias horas, e a ferida induzida aumenta a atividade da FAL e o acúmulo de ácido clorogênico é ainda mais estimulado pela infecção por Phytophthora infestans, SMITH & RUBERY (1981).

### **2.3. Alteração na parede celular devido a formação de periderme em ferimento, relacionada com a resistência às doenças.**

Entre outros fatores, a resistência dos frutos a determinadas doenças pós-colheita está diretamente correlacionada com a capacidade de produzir periderme lignificada na parede de penetração do patógeno, estímulo à proliferação celular e formação de periderme de ferida. Observações microscópicas em maçãs injuriadas revelaram a formação de uma barreira e um espessamento da parede, estendendo-se por quatro a seis camadas celulares ou mais, do local da ferida, LAKSHMINARAYANA et alii (1987).

As peridermes de feridas são tidas como mecanismos de defesa passivo, pois frequentemente formam-se depois e em local distante da delimitação do patógeno. A interpretação de passividade dada às peridermes de feridas quanto a resposta a interação patógeno hospedeiro, parece ser um tanto restritiva, uma vez que eventos que fazem parte na formação desta, possuem um papel significativo na defesa. A formação de lignina e suberina sugere vários modos pelos quais estes polímeros interferem com o ingresso do

patógeno, VANCE et alii (1980).

Talvez a evidência mais simples e direta para a efetividade da periderme de ferida quanto a resistência, origina-se dos estudos confirmando que, com o envelhecimento da ferida, o tecido torna-se mais resistente a infecção, BIGGS (1986).

Em peras, aquecidas antes do armazenamento, a baixa incidência de podridão causada por Mucor periformis e Phialophora malorum, pode ser devido, em parte, ao estímulo dado a cicatrização pela temperatura morna, SPOTTS & CHEN (1987).

Em trabalhos para determinação de condições ótimas para amadurecimento de pêssegos colhidos mecanicamente, consegue-se reduzir a incidência de podridão pós-colheita causada por Monilinia fructicola e podridão por Rhizopus, submetendo os frutos por 24 horas a uma temperatura de 41 °C e 90% de umidade relativa. Sob essas condições, ocorre uma aceleração nos processos de cura de ferida no fruto, no qual se forma uma barreira física, que impede ou retarda o desenvolvimento do fungo, DEKAZOS (1985).

A modificação das paredes celulares causada pela lignina e suberina é geralmente tida como responsável em torná-las mais resistentes as forças exercidas pelos patógenos e a degradação de polissacarídeos.

Outra maneira destes polímeros restringirem a atividade dos patógenos é funcionando como barreiras à difusão de nutrientes e/ou evitando a exposição de células hospedeiras saudáveis as enzimas do patógeno, toxinas e outros metabólitos patogênicos necessários a patogênese. Tais barreiras de difusão podem servir

também para concentrar fitoalexinas ou outros compostos antibióticos no local de infecção, e a atividade de compostos semelhantes que venham a ser despreendidos dos polímeros durante a infecção, VANCE et alii (1980) e HAMMERSCHMIDT & KUE (1982).

A presença de substâncias lignificantes bem como altos teores de fenólicos e taninos evidenciaram a ocorrência de cura de feridas em maçãs, LAKSMINARAYANA et alii (1987), tangerinas, BROW & BARMORE (1977), e mamão, STAHGHELLINI & ARAGAKI (1966), bem como um grande aumento na resistência dos frutos a infecção com relação a frutos não curados. A lignificação pode tornar as paredes celulares mais resistentes à penetração mecânica do patógeno. A lignina é um dos mais importantes biopolímeros da natureza e é resistente à degradação por vários microrganismos.

Tem-se demonstrado que a lignificação pode ser induzida por vários elicitores, dentre os quais fragmentos de paredes celulares de plantas superiores, fragmentos de micélios ou esporos de fungos, pectinas, ácidos poligalacturônicos e quitosanas, VANCE et alii (1980).

A unidade básica das ligninas é o fenilpropano. Dos resultados de experimentos nos quais a L-fenilalanina radioativa e ácido cinâmico foram testados como precursores de lignina, KOUKOL & CONN (1961), postularam que L-fenilalanina é convertida em ácido cinâmico através de uma sequência de reações envolvendo transaminação, redução e desidratação.

As ligninas verdadeiras são formadas pela polimerização oxidativa dos álcoois p-coumaril, coniferil e sinapil. Taninos condensados e polímeros similares também são formados por reações

acopladas de oxidação de fenólicos, LEWIS & YAMAMOTO (1990).

A indução de deposição de lignina em folhas de trigo parece ser um fator significativo na resistência contra Fusarium graminearum e Penicillium oxalicum, RIDE & BARBER (1987). A deposição rápida de lignina na superfície do tubérculo de batata foi associada com resistência ao fungo não patogênico, HAMMERSCHMIDT (1984). Tratamento de tecido tuberoso com ácido aminooxyacético, um inibidor competitivo da FAL, reduziu o acúmulo de lignina e induziu susceptibilidade ao Cladosporium cucumerium, AMPOMAH & FRIEND (1988).

Peroxidases da parede celular também estão envolvidas na lignificação, suberização e na ligação cruzada de ácidos fenólicos para polissacarídeos, FRY (1986).

Observações histológicas em frutos do tomateiro injuriados mostraram claramente uma lignificação dos tecidos cicatrizados das bordas da injúria sobre o pericarpo dos frutos. A deposição da lignina ocorreu no mínimo em oito dias, sendo que a reação mais intensa ao fluroglucinol-HCL se deu em 20 dias. OS frutos permaneceram turgescerentes e mantiveram seu desenvolvimento dado a formação de uma "pseudo-cicatriz" constituída essencialmente de células necrosadas, observação esta que já foi constatada em tecidos de outros vegetais, FLEURIET & DELOIRE (1982).

Feridas inoculadas em limões com Geotrichum candidum apresentaram maior produção de lignina. O local de ocorrência de maior concentração de esporos do inóculo, propiciou maior acúmulo do polímero, BAUDOIN & ECKERT (1985).

Em frutos cítricos, as respostas à injúria que estão

envolvidas com resistência à doenças, incluem a deposição de lignina e a produção de felema e felogênio, assim como um aumento de fenólicos livres, BAUDOIN & ECKERT (1985)

A suberina é, como a lignina, uma substância incrustante da parede celular. Nos vegetais, substitui a cutina nas epidermes inferiores. É composta por ácidos graxos e álcoois de cadeia longa, associados com fenólicos. A indução de ferida leva ao processo de suberização, KOLATTUKUDY (1984).

Um grau significativo de resistência que se desenvolve ao fungo do cancro de pêssego, antes da formação da periderme, é coincidente com a formação de uma extensa zona limitante lignosuberizada. Isto surge a formação de tecidos lignosuberizados na zona limitante da ferida impedindo o desenvolvimento do cancro, mas é insuficiente para dar proteção completa ao ingresso dos fungos patogênicos. A camada de células de feloderma suberizada na periderme em desenvolvimento aparenta ser mais importante em conferir proteção completa, BIGGS (1986) e BOSTOCK & MIDDLETON (1987).

Um polissacarídeo que está diretamente envolvido no processo de cura de ferida é a calose. Este composto é formado por resíduos de beta 1,3 glucopiranosose e encontra-se largamente distribuído nos vegetais.

O conceito da formação de calosidade como processo de cura de ferida tem sido bem aceito. Sua formação tem sido constatada como uma resposta à penetração fúngica tendo a função de formar uma barreira para prevenir perdas excessivas por difusão através da região afetada do hospedeiro, AIST (1976).



A calosidade pode ser um pré-requisito para o sucesso do estabelecimento da relação parasítica. A formação de calos pode permitir a entrada do fungo na célula hospedeira sem que este cause prejuízos significativos ao fruto, AIST (1976) e GOLOMB et alii (1984).

Em mamões inoculados com C.gloeosporioides, C. falcatum e H. stenospelum, o aumento significativo de calose foi observado somente dentro das áreas inoculadas. Estes depósitos foram correlacionados com apressoria destes três organismos. Em áreas adjacentes dos sítios inoculados ocorreu muito pouco, senão nenhum acúmulo de calose, STAHHHELLINI & ARAGAKI (1966).

Acredita-se que o acúmulo de lignina e calose em cascas de tangerinas é uma resposta à penetração e germinação de conídios de C. gloeosporioides, BROWN & BARMORE (1977). As cascas de tangerinas resistentes também apresentaram componentes fenólicos e taninos.

Há fatores externos que afetam a cicatrização tais como temperatura, umidade relativa, luz e composição de oxigênio e dióxido de carbono, NNODUE et alii (1982) e BRINDLE et alii (1985). Existem também estudos comparativos quanto a influência de fatores intrínsecos como cultivar, estágio de desenvolvimento e "deficit" de água nas taxas de cicatrização e sua relação à resistência a certos patógenos, WOOD (1967) e BIGGS (1986).

Umidade relativa entre 70-100% a 20 °C parece ser condição ótima para suberização em batatas, mas, temperaturas mais elevadas não aumentam a taxa apreciavelmente. Tensões de oxigênio menores que níveis ambientais e altos níveis de dióxido de

carbono geralmente reduzem a suberização e formação de peridermes em batatas, WIGGITON (1974).

A influência do estágio de desenvolvimento do vegetal nos componentes de cicatrização tem sido demonstrado em citrus e maçãs. Injúrias em frutos de limão verde claro desenvolvem resistência ao Geotrichum candidum mais rapidamente que nos frutos amarelos, BAUDOIN & ECKERT (1985). Apesar da deposição de lignina ter sido correlacionada com o desenvolvimento de resistência a doença em feridas de citrus, BROWN & BARMORE (1983), a base para a diferença entre limões com diferentes pigmentações ainda não está clara e não parece ser simplesmente devido a diferença na deposição da lignina. Maçãs imaturas em desenvolvimento possuem uma reação rápida a ferimentos resultando na formação de periderme de ferida, ao passo que em frutos maduros, além da reação ser reduzida, é caracterizada pela ausência de periderme, SKENE (1981).

Maçãs maduras pré-climatéricas respondem aos ferimentos fundamentalmente através do reforço da parede celular com lignina, taninos, fenóis e calose e com pequena ou nenhuma deposição de suberina, LAKSHMINARAYANA (1987). Estas injúrias desenvolveram um grau significativo de resistência à invasão pelo Botrytis cinerea e Penicillium expansum 4 dias após a injúria.

A ausência de infecção sob condições de alta umidade relativa pode ser explicada geralmente pela formação de periderme de ferida que efetivamente impede o desenvolvimento de organismos patogênicos. Esse fenômeno foi observado em laranja, ISMAIL & BROWN (1975) e pomelos, GOLOMB et alii (1984).

desenvolvimento da resistência em limões não foi devido à desidratção da ferida. Para comprovar essa afirmativa, os autores mantiveram as feridas abertas com aplicação de água estéril no local de ferimento antes da inoculação, para evitar o ressecamento dos tecidos. Essas feridas, após inoculação, foram mantidas em condições de elevada umidade relativa e também apresentaram resistência.

Ha também algumas barreiras erguidas por células individuais tais como papilas, halos e depósitos contendo silicone, STUMPF (1985), e respostas de tecidos tais como tilose. Calose é o componente mais comum nas papilas, mas lignina, outros materiais fenólicos, celulose e sílica podem estar presentes.

#### **2.4. O envolvimento da parede celular no processo infeccioso**

Os vegetais possuem mecanismos de defesa efetivos, pois apenas alguns patógenos são capazes de romper essas defesas, infectando e colonizando a planta. Assim, a susceptibilidade de plantas a doenças parece ser mais exceção que regra geral, ROMEIRO (1987).

Em vários momentos da patogenia acometida por bactérias ou fungos, acontece uma interação entre o patógeno e os carboidratos do hospedeiro, os quais determinam a habilidade do patógeno de produzir enzimas capazes de degradar as paredes celulares do hospedeiro. A produção destas enzimas, é que determinará ou não o início de uma infecção. Assim, o estudo das enzimas secretadas pelos fungos durante a invasão, bem como a análise estrutural dos

polissacarídeos da parede celular do vegetal é extremamente útil na determinação da natureza da interação hospedeiro-patógeno, GROSS & MOLINE (1986).

## **2.5. A habilidade universal do patógeno de plantas para produzir enzimas que degradam polissacarídeos.**

A parede celular é a primeira fonte de carbono encontrada pelo fungo patogênico após a penetração da casca ou cutícula da planta hospedeira. Fungos patogênicos produzem enzimas hidrolíticas que degradam os polissacarídeos da parede celular e utilizam os constituintes monossacarídeos como uma fonte de carbono para seu crescimento e desenvolvimento, GROSS & MOLINE (1986).

A parede celular de frutos é um estágio dinâmico; certos componentes são constantemente renovados, e mudanças substanciais na composição dos carboidratos ocorrem durante o amadurecimento e amaciamento dos tecidos, GROSS & MOLINE (1986).

As enzimas degradantes da parede celular são frequentemente glicoproteínas extracelulares de baixo peso molecular, estáveis, e sua atividade pode ser representada pelas múltiplas formas ou isoenzimas às quais diferem na eficiência, tamanho, regulação, estabilidade aos fatores do hospedeiro e na habilidade para degradar a parede celular, COOPER (1983).

### **A- Degradação dos polissacarídeos pécnicos.**

As cadeias de ramnogalacturonas são degradadas pelas poligalacturonases hidrolíticas ou por liases as quais formam uma

ligação não saturada entre os carbonos 4 e 5 da galactana (Gal A) no final não redutor das cadeias. Elas podem ser subdivididas dentro de formas que atacam regiões internas da cadeia (endo) ou terminais (exo), e com base na sua especificidade para polímeros com grupos carboxil esterificados (metoxil) ou não esterificados os quais são conhecidos como pectina e ácido poligalacturônico respectivamente; as correspondentes enzimas são polimetilgalacturonase (PMG), poligalacturonase (PG), pectina liase (PL) e poligalacturonase liase (PGL). Os grupos metoxil da pectina são removidos pela pectina metil esterase (PME), as quais podem agir concomitantemente com poligalacturonases (PGs) ou poligalacturonases liase (PGLs), COOPER (1983).

#### B- Degradação da hemiceluloses

As cadeias de xiloglucanas são degradadas pela endo-beta-1,4 glucanase. As beta-1,4 xilanas e mananas são fortemente quebradas pelas endo-enzimas produzindo oligômeros os quais podem ser futuramente degradados pelas exo-enzimas ou glicosidases. Muitos patógenos produzem glicosidases específicas, as quais podem desprender alguns resíduos de polímeros tais como remover arabinose de xilanas e galactose de galactoglicomananas, COOPER (1983).

#### C- Degradação da celulose.

A conversão de celulose a glicose requer um complexo de enzimas originalmente designado por Reese citado por COOPER (1983), como C1, Cx e Celobiase. C1 torna a celulose cristalina acessível para subsequente ação da Cx, a qual pode envolver a quebra de ligações hidrogênicas bem como glicosídicas. A endo-

beta-1,4 glucanase (Cx) converte a cadeia livre em oligômeros, especialmente o dímero celobiose, o qual é finalmente degradado à glicose pela celobiase (beta glicosidase). Em tecido maturo a quebra da celulose é frequentemente limitada pela lignina, sendo necessário que o fungo degrade os dois polímeros simultaneamente via enzima celobiase: quinona oxidoreductase, Eriksson citado por COOPER (1983).

Através do estudo do tecido infectado de laranja pelo Penicillium italicum, encontrou-se três formas de poligalacturonases (PG), que foram designadas PGI, PGII e PGIII. A PGI foi caracterizada como uma exoenzima e PGII e PGIII como endoenzimas. Devido a alta atividade da exo PG no tecido infectado, sugeriu-se ser ela responsável pela excessiva acumulação de ácido D-galacturônico que ocorre durante a infecção pelo mofo azul. Portanto a acumulação do ácido galacturônico e sua difusão dentro do tecido saudável é um fator essencial na patogenicidade deste mofo. O ácido galacturônico é capaz de induzir a tumefação da parede celular e contribuir para a plasmólise e outros sintomas da patogênese, HERSHENHORN & BARASH (1990).

## **2.6. Controle ambiental da produção das enzimas degradadoras de polissacarídeos pelos patógenos de plantas.**

O meio ambiente do microrganismo patogênico frequentemente determina se o patógeno produz uma enzima em particular. Esta determinação da produção de enzimas pode ser controlada por mecanismos diversos. Fusarium oxysporum e Fusarium lycopersici

secretam tanto pectina esterase quanto poligalacturonase no meio de cultura quando a pectina é a fonte de carbono, mas produz somente pectina esterase quando a pectina é transformada em glicose, WAGGONER & DIMOND (1955). Dados deste tipo sugerem um dos três mecanismos:

A - ambas enzimas são produzidas sem indução específica e a síntese de poligalacturonase é inibida pela glicose.

B - a pectina esterase é secretada sem indução e a síntese da poligalacturonase é induzida pela pectina, porém não é pela glicose.

C - a síntese de ambas enzimas é induzida pela pectina mas somente a síntese da pectina esterase é induzida pela glicose.

Controle diferencial da síntese de endo e exo-poligalacturonases tem sido observado em três espécies de Botrytis, HANCOCK et alli (1964). Botrytis allii produz tanto endo quanto exo-poligalacturonases, quando crescem em folhas de cebola destacadas ou em folhas de cebolas intactas, mas falham em produzir qualquer enzima quando crescem em caldo de batata-dextrose. Botrytis cinerea e Botrytis squamosa por outro lado, produzem endo-poligalacturonases em todos os três meios, porém secretam quantidades significativas de exo-poligalacturonases somente quando desenvolvem-se em folhas destacadas.

Um sistema de enzimas degradadoras de xilanas extracelular produzido pelo patógeno da uva Diplodia viticola está também sob controle ambiental, STROBEL (1963). Este fungo secreta xilosidase quando se desenvolve em superfície de uvas esterilizadas ou autoclavadas, ou em cultura líquida contendo xilanas, celulose, xilose ou arabinose, mas não quando a glicose ou a celobiose é a



fonte de carbono.

Em uma série de trabalhos HORTON & KEEN (1966) reportaram seus estudos do controle de endo-poligalacturonase e síntese de celulase em Pyrenochaeta terrestris. Eles observaram que a síntese de celulase neste fungo é controlada por uma combinação de indução e inibição, um mecanismo, o qual fornece singular sensibilidade para a mudança ambiental, KEEN & HORTON (1966). A síntese de celulase, neste patógeno é induzida pela celulose, mas existe uma concentração ótima, na qual a síntese de celulase é inibida. Quando a concentração de celulose excede o nível ótimo, a taxa de glicose liberada pela celulose excede a taxa na qual a glicose é utilizada pelo fungo. Quando o acúmulo de glicose liberada excede a concentração de 0,0005  $\mu$ M, a síntese de celulase é inibida.

Colletotrichum lindemuthianum é capaz de produzir diversas enzimas degradadoras de polissacarídeos, ENGLISH & ALBERSHEIM (1969). Quando a cepa alfa ou gama deste fungo se desenvolve em meio contendo galactose como única fonte de carbono, grande quantidade de alfa-galactosidase é secretada, mas na presença de glicose ou xilose, a síntese de alfa-galactosidase é inibida. Beta-glicosidase parece ser produzida continuamente nas cepas alfa do Colletotrichum lindemuthianum, enquanto que a beta-xilosidase só é induzida pelas cepas alfa ou gama do fungo, quando estas desenvolvem em culturas contendo xilose como única fonte de carbono. As várias cepas de Colletotrichum lindemuthianum, as quais são caracterizadas pelas suas virulências diferenciais para certas variedades de Phaseolus



vulgaris, parece ter sistemas diferentes de controle da síntese de enzimas degradadoras.

Esses resultados sugerem que os carboidratos no meio ambiente dos patógenos de plantas regulam a produção de enzimas degradadoras de polissacarídeos. Portanto, pequenas mudanças na composição, estrutura ou acesso do carboidrato do hospedeiro, pode alterar qualitativa e quantitativamente a produção por um patógeno invasor, das enzimas degradadoras de polissacarídeos.

## 2.7. Especificidade dos polissacarídeos pelas enzimas degradadoras.

Em plantas superiores, o espectrum de açúcares e derivados de açúcares de que é formada a parede polissacarídica, ALBERSHEIN (1965) é muito amplo, ocorrendo uma grande variedade de ligações, existindo no total, aproximadamente 10 açúcares neutros e ácidos urônicos que constituem os polissacarídeos da parede celular de plantas, e de um número aproximadamente igual de açúcares derivados como éter e éster. As unidades monoméricas de polissacarídeos estão interconectadas através de ligações glicosídicas alfa ou beta e essas ligações podem ser feitas no carbono 3 ou 4 do próximo açúcar. Ramificações da parede polissacarídica é mais comum que exceção. Como resultado, a especificidade ou variedade da estrutura molecular a qual as paredes celulares das plantas exibem para os patógenos, são ilimitadas. As enzimas degradadoras exibem certos limites de especificidade. Uma exo-beta-1,3 glicanase, por exemplo, tem

pouca habilidade para degradar beta-1,4 ou beta-1,6 glicanas, enquanto uma beta-1,4 glicanase não hidrolisa alfa-1,4 glicanas ou beta-1,4 galactanas, REESE et alii (1968). Esta especificidade está subordinada aos monossacarídeos agrupados por ligações glicosídicas, para ambas configurações (alfa ou beta).

No reconhecimento dos componentes dos polissacarídeos, as enzimas degradadoras respondem a presença tanto dos substitutos, quanto do grupo amino no átomo de carbono 2, um grupo carboxil no átomo de carbono 6, grupos metil éter e ésteres de ambos os grupos hidroxil e carboxil, tão bem quanto a estereoquímica e o estado de oxidação de um átomo de carbono em particular. Semelhantes especificidades implicam que pequenas alterações na estrutura do polissacarídeo pode alterar drasticamente sua suscetibilidade para degradação por uma enzima em particular.

Se os polissacarídeos da parede celular das plantas estão envolvidos na resistência à doença, estes polímeros possuem estruturas específicas, e a biossíntese de cada um, pode ser controlada. Assim, a composição dos polissacarídeos pode ser cuidadosamente determinada, podendo dificultar a formulação da resistência específica ou a suscetibilidade baseando-se na presença, ausência ou alternância de uma ou mais macromoléculas, NEVINS et alii (1967).

Resultados de experimentos com células de sycamore mostraram que as mesmas desenvolvem-se satisfatoriamente apesar de suas paredes possuírem diferentes constituintes, NEVINS et alii (1967). Assim, enquanto a composição das paredes celulares nas plantas é controlada, as composições precisas da parede podem não



planta. Então, novas variedades que exibem diferentes mecanismos de resistência às doenças podem apresentar paredes alteradas sem afetar grandemente a segurança do metabolismo da planta. É improvável que outras organelas celulares possam ser modificadas neste grau, sem um resultado fatal. Consequentemente é difícil imaginar uma outra organela possuindo o potencial da parede para o desenvolvimento de novos tipos de mecanismos de resistência.

#### 2.8. Evidência direta do envolvimento dos polissacarídeos da parede celular e das enzimas degradadoras de polissacarídeos na resistência às doenças.

O desenvolvimento da resistência à infecção em hipocótilos de feijão Red Kidney em maturação por Rizobium solani está correlacionado com a conversão da pectina a pectato de cálcio nas paredes celulares do hipocótilo, BATEMAN & LUMSDEN (1965). O pectato de cálcio é resistente à poligalacturonase secretada por estes fungos, BATEMAN (1964).

Rizobium solani secreta uma variedade de enzimas degradadoras de polissacarídeos quando se desenvolvem em cultura de parede celular de hipocótilo de feijão Red Kidney de 4-20 dias de idade, como única fonte de carbono. O filtrado destas enzimas pode degradar paredes celulares isoladas de hipocótilos de feijão Red Kidney susceptíveis, de 4 dias de idade, mas degradam somente superficialmente paredes de hipocótilos de plantas resistentes, de 20 dias de idade. Além disso, extratos preparados de plantas infectadas por Rizobium solani com lesões precocemente

detectáveis, podem degradar paredes de hipocótilos de feijão de 4 dias de idade, mas degradam somente superficialmente as paredes de plantas com 20 dias de idade. Dando seguimento ao tratamento com extrato de lesões imaturas, isolados de paredes celulares de plantas de 4 dias foram observadas perdas de 59% de arabinose, 19% de xilose, 72% de galactose e 23% de glicose, normalmente provenientes da hidrólise ácida. Entretanto, 43% dos açúcares neutros provenientes de plantas de 4 dias de idade foram removidos por ação de enzimas do extrato da lesão, enquanto que somente 4% dos açúcares neutros foram removidos das paredes de plantas com 20 dias de idade, BATEMAN et alii (1969). A resistência dos hipocótilos de feijão com 20 dias de idade pode ser explicada através do estudo de NEVINS et alii (1968) que observaram a composição dos açúcares neutros da parede celular dos hipocótilos de feijão Red Kidney, Pinto e Small White durante os primeiros 28 dias e constataram que os açúcares neutros predominantes nos primeiros dias foram galactose, glicose e arabinose, sendo que quantidades relativas destes açúcares declinaram com a idade com diferentes taxas e ocorrendo um aumento da xilose. No 4<sup>o</sup> e no 18<sup>o</sup> dia a composição da parede das três variedades era similar, sendo que a variedade Small White atingiu a composição matura da parede no 8<sup>o</sup> dia, já a Red Kidney, atingiu entre o 10<sup>o</sup> e o 12<sup>o</sup> dia. O particular patógeno para o qual estas três variedades exibem resistência diferencial, produz enzimas que liberam principalmente arabinose, galactose e xilose. Portanto a diferente suscetibilidade destas variedades está relacionada com a respectiva habilidade de atingir a composição



matura da parede celular, que já não serve como um substrato ideal para a atividade enzimática devido as alterações da composição dos açúcares neutros.

Fenômeno semelhante foi observado na habilidade de enzimas extracelulares obtidas de culturas de Colletotrium lindemuthianum. ENGLISH & ALBERSHEIM (1969), verificaram que essas enzimas degradam compostos de parede celular de feijões com 5 dias de idade, sensíveis à infecção, porém, não eram capazes de degradar compostos de parede celular de Hipocótilos da mesma planta, resistente com 18 dias de idade. Dos açúcares neutros removidos das paredes de hipocótilos de plantas sensíveis ao tratamento com enzimas secretadas por Colletotrichum lindemuthianum ou por Rizobium solani, mais da metade é galactose. Isto sugere que a degradação dos polímeros constituídos de galactose em parede celular de hipocótilos de feijão é essencial para a patogênese. Segundo GROSS & SALTVEIT Jr (1982), a galactose é tóxica para vários tecidos de plantas. COLCLASURE & YAAP (1976), sugeriram que essa toxicidade é resultante da evolução do etileno promovida pela galactose. Através do estudo das características de uma linhagem de cana-de-açúcar galactose-adaptada, desenvolvida em cultura celular, MARETZI & THOM (1978), constataram que a atividade de UDP-GAL-4 epimerase é 10 vezes maior em células galactose-adaptada do que em culturas desenvolvidas em meio contendo sacarose como fonte de carbono, favorecendo assim o fornecimento de glicose 1P para a via glicolítica e conseqüentemente o crescimento no meio contendo galactose da linhagem adaptada. A baixa atividade dessa enzima nas culturas contendo sacarose, promoveu o acúmulo de UDP

galactose. Após a transferência dessas células para um meio contendo galactose como fonte de carbono, o acúmulo de UDP galactose foi intensificado devido a elevada atividade de UDP-GAL-pirofosfato. O metabolismo de UDP-GAL para glicose 1P foi restrito nas células não adaptadas, portanto, a toxicidade pode desenvolver-se à partir da acumulação de UDP-GAL quando excesso de galactose exógena foi fornecida as culturas não adaptadas.

As interações hospedeiro-patógeno refletidas na influência dos polissacarídeos da parede celular no controle da produção de enzimas degradadoras de polissacarídeos podem também ser explicadas, teoricamente, através de observações genéticas relativas à patogênese do sistema Phaseolus vulgaris: Colletotrichum lindemuthianum, ALBERSHEIM et alii (1969). Funções teóricas são demonstradas para 2 genes de virulência em Colletotrichum lindemuthianum e para 2 genes de resistência em Phaseolus vulgaris. Supõe-se que o Colletotrichum lindemuthianum seja virulento somente ao produzir grandes quantidades de alfa galactosidase. A herança da virulência em Colletotrichum lindemuthianum poderá ser do tipo recessivo e dominante. As cepas alfa, beta, gama e delta do Colletotrichum lindemuthianum são distinguidas por suas virulências diferenciadas à respeito de certas variedades de Phaseolus vulgaris. Quando a virulência é inerente ao tipo recessivo, postula-se que suficientes taxas de alfa galactosidase sejam produzidas, resultando ação virulenta. Quando a síntese desta enzima é inibida, a quantidade é insuficiente para estabelecer a infecção. O efetor (mediador), uma pequena molécula que combina com a ação do gene produtor e



regulador da atividade de inibição da síntese de enzimas, é, para efeito de exemplo a glicose. Assim a planta, poderá ser resistente quando fornecer ao patógeno glicose suficiente para inibir a síntese de alfa galactosidase. Reciprocamente, o patógeno será virulento se não obter do hospedeiro quantidade suficiente de glicose para reprimir a síntese de alfa galactosidase.

Um gene de resistência (Cl 2) é caracterizado em função da ativação da enzima que adiciona glicose na cadeia lateral de polissacarídeos da parede celular. Estes resíduos glicosil são atacados através das ligações alfa glicosídicas. O outro gene de resistência (Cl 3) ativa uma enzima que adiciona glicose na cadeia lateral, os quais são atacados através das ligações beta glicosídicas.

Assim parede celular de variedade de feijão, Genefer Market pode conter alfa glicosídeos, de Red Kidney beta glicosídeos, e as de Perry Marrow alfa e beta glicosídeos.

Patógenos nos quais a virulência é herdada pelo tipo recessivo, a caracterização é feita pela ausência da produção de gene específico. O gene "2" para virulência inibe a síntese de alfa glicosidase e o gene "3" inibe a síntese de beta glicosidase. Assim, a cepa alfa produz beta glicosidase e a cepa beta produz alfa glicosidase, enquanto a gama e delta não produzem nenhuma dessas enzimas.

As respostas prognosticadas por este sistema hipotético são coincidentes com as observadas por, PERSON (1959) e GOTH & ZAUMEYER (1965). Por exemplo, a cepa alfa que falha na produção



de alfa glicosidase, não pode retirar glicose da parede celular de Genefer Market (que possui alfa glicosídeos). Em consequência quando a cepa alfa o ataca, a síntese de alfa galactosidase não é inibida e a infecção pode ocorrer. Entretanto, a cepa alfa ainda que incapaz de produzir alfa glicosidase, produz beta glicosidase, que hidrolisa os beta glicosídeos das paredes de Red Kidney. Portanto a síntese de alfa galactosidase é inibida quando a cepa alfa ataca Red Kidney e a ausência de alfa galactosidase impede o estabelecimento da infecção. Em Perry Marrow, as paredes possuem alfa e beta glicosídeos, e são resistentes, tanto a cepa alfa quanto a beta. Por outro lado, a variedade Perry Marrow é sensível às cepas delta e gama, pois nenhuma é capaz de sintetizar alfa ou beta glicosidase, conseqüentemente a síntese de alfa galactosidase não é inibida.

Consideraremos agora o caso no qual a virulência de Colletotrichum lindemuthianum é herdada pelo tipo dominante. Novamente supõe-se que a virulência requer a produção de grande quantidade de alfa galactosidase. Neste caso, a enzima necessária é a exo-alfa-galactosidase. Entretanto, para que a degradação significativa da galactona ocorra, este substrato deve estar livre de interferência das cadeias laterais. Para este caso, a glicose não atua como co-repressor da síntese de alfa galactosidase. O gene de resistência (Cl 2) novamente ativa a enzima que cataliza a adição de alfa glicosídeos para a parede e o gene (Cl 3) para resistência ativa a enzima que adiciona beta glicosídeos. Neste caso entretanto, é postulado que, tanto, alfa ou beta glicosídeos, são adicionados à galactona que somente

poderá ser degradada pelo patógeno produtor de exo-alfa-galactosidase se a resposta virulenta ocorrer. Quando a virulência do patógeno é inerente ao tipo dominante, a virulência reflete a presença da produção de um gene específico. Nesse caso, o gene "2" para a virulência ativa alfa glicosidase e o gene "3" ativa beta glicosidase. Assim, a cepa alfa produz alfa glicosidase e a cepa beta produz beta glicosidase, enquanto a gama e a delta produzem as duas enzimas.

Novamente, as respostas prognosticadas são correspondentes com as observadas por, PERSON (1959) e GOTH & ZAUMEYER (1965). A alfa glicosidase produzida por cepas alfa remove a glicose da cadeia lateral da galactona de Genefer Market fazendo com que a galactona fique sensível a degradação por exo-alfa-galactosidase. Esta é a conduta para infecção de Genefer Market por cepas alfa. A alfa glicosidase da cepa alfa não pode remover resíduos de beta glicosil da galactona da parede celular de Red Kidney, tornando a galactona imune ao ataque da exo-alfa-galactosidase e Red Kidney resistente a infecção por cepa alfa. Perry Marrow, que possui resíduos alfa e beta glicosil ligados a galactona é resistente as cepas alfa e beta mas é susceptível a cepas delta e gama as quais secretam uma mistura de alfa e beta glicosidases. Portanto, variedades resistentes serão selecionadas baseando-se nas características específicas da parede polissacarídica. A estrutura da parede pela qual é feita a seleção é determinada através do estudo dos carboidratos no controle da produção de enzimas degradadoras de polissacarídeos do patógeno.

As barreiras estruturais e químicas formadas em plantas após



injúria mecânica e após a infecção sugerem que sinais comuns sejam gerados em respostas a ambos estresses. Tem-se apontado também que a taxa de formação de tal barreira é provavelmente um determinante chave na resistência às doenças, AIST (1983). Semelhantemente, a habilidade dos patógenos em comprometer a formação de barreiras parece ser também importante para o sucesso na colonização do tecido do hospedeiro, BIGGS (1986) e BIGGS & BRITON (1988). Existe evidência correlativa substancial para suportar estas noções, apesar que o desafio será o de separar respostas triviais daquelas respostas dos hospedeiros que são as mais inibitórias aos patógenos, e estabelecer a magnitude da resposta necessária para dar proteção. Progresso em nossa habilidade em manipular respostas a ferimentos a níveis genéticos deveria resolver questões com respeito as suas contribuições relativas a resistência. Devem existir muitos mecanismos contribuindo com a proteção do tecido, apesar da importância de qualquer uma das respostas em si provavelmente depender da combinação específica de hospedeiro patógeno. Ao se compreender os fatores que regulam o despreendimento de elicitores de plantas e patógenos, poderá surgir metas para modificação da interação hospedeiro-patógeno, resultando num aumento das respostas de defesa a patógenos invasores via ferimentos.

### 3. MATERIAL E METODOS

#### 3.1. Procedência do material.

Foram utilizados pêssegos maduros, da cultivar Biuti, procedentes da fazenda experimental da EPAMIG, de Caldas, Sul de Minas Gerais, situada a 900m de altitude, aproximadamente, apresentando coordenadas que variam de 21<sup>o</sup> 58' a 21<sup>o</sup> 10' de latitude sul e 46<sup>o</sup> a 48<sup>o</sup> de longitude W. Gr. Os frutos foram colhidos e transportados no mesmo dia para o Departamento de Ciência dos Alimentos, ESAL-Lavras, onde foi conduzido o experimento.

#### 3.2. Coleta e preparo das amostras

Os frutos foram coletados, de acordo com a técnica descrita por Hulme et alii citados por TEIXEIRA (1979), considerando-se sua posição em relação aos pontos cardeais, altura do terço médio da planta e posição externa em relação à copa. Foram coletados aproximadamente 900 frutos da cultivar em estudo.

Após a colheita, foi realizada uma pré-seleção visual dos frutos escolhendo-se aqueles sem injúrias mecânicas, sem infecção aparente e que apresentavam pedúnculo. Estes frutos foram embalados em caixas de papelão e enviados à ESAL, Lavras Sul de Minas Gerais, onde foram imediatamente lavados com água. Em seguida, foram imersos por três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, para prevenir o ataque fúngico e, então, colocados para secar ao ar.

Além da ausência de injúrias visuais e presença de pedúnculo, foram selecionados frutos que apresentavam tamanho, textura e cor semelhantes, como também grau de maturação.

Os pêssegos foram separados em grupos de 15 frutos cada e acondicionados em bandejas plásticas, para a realização dos experimentos.

### 3.3. Instalação dos experimentos.

#### Experimento 1:

Para observações histoquímicas e químicas das transformações dos tecidos e paredes celulares durante o período de cura de ferimento, composto de dois grupos de frutos:

Grupo 1: controle (sem injúria mecânica).

Grupo 2: ferido mecanicamente e submetido à cura de ferimento por quatro diferentes espaços de tempo 0, 24, 48 e 72 horas.

O delineamento constituiu-se num fatorial 2x4 inteiramente



casualizado com três repetições. A unidade experimental constou de 15 frutos.

#### Experimento 2:

Para os estudos de resistência e observações histoquímicas e químicas dos tecidos inoculados com suspensão de esporos de Monilinea fructicola, após os diferentes períodos de cura de ferimento. O experimento foi realizado utilizando-se três grupos de frutos:

Grupo 1: frutos feridos mecanicamente e submetido à cura de ferimento por quatros diferentes espaços de tempo 0, 24, 48 e 72 horas

Grupo 2: frutos feridos mecanicamente e inoculados após a cura de ferimento, para estudos de resistência a infecção

Grupo 3: semelhante ao Grupo 2, utilizado para observações histoquímicas.

O delineamento constituiu-se num fatorial 2x4 inteiramente casualizado com três repetições. A unidade experimental constou de 15 frutos.

#### 3.4. Caracterização dos frutos.

Após a colheita, os frutos foram armazenados em ambiente com temperatura controlada (20 °C) e umidade relativa do ar entre 75 - 80%.

O estágio de maturação foi caracterizado em amostra de 30 frutos integros para cada período, através das seguintes análises físicas, fisico-químicas e químicas:

- a) peso de fruto (g), obtido por gravimetria com auxílio de balança semi-analítica;
- b) peso do caroço (g), obtido individualmente com auxílio de balança semi-analítica;
- c) relação polpa/caroço, dividindo-se a diferença entre o peso do fruto e o caroço pelo peso deste último;
- d) textura ( $1/\text{pol}^2$ ), medida em penetrômetro Magness Taylor, convertida e expressa em Newton, por multiplicação do valor em  $1/\text{pol}^2$  pela constante 4,11.
- e) diâmetro longitudinal e transversal (cm), medidos com o auxílio de um paquímetro;
- f) acidez total titulável, obtida segundo a técnica aconselhada pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), expressa em porcentagem de ácido cítrico;
- g) pH, determinado em potenciômetro com membrana de vidro, segundo, técnica do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).
- H) sólidos solúveis totais, determinados por refratometria, <sup>COM FORÇA</sup> conform <sub>conform</sub> indicação da A O A C (1970), utilizando-se refratômetro tipo Abbé.

### 3.5. Técnica do ferimento mecânico e período de cura.

A fim de evitar uma possível contaminação com microrganismos indesejáveis, os frutos foram feridos assepticamente em capela de fluxo contínuo. A injúria mecânica foi realizada com estilete (1mm de diâmetro x 1,5mm de comprimento), apresentado na Figura 1, em quatro locais equidistantes na superfície do fruto.



Fig. 1 - Estilete utilizado para injuriar mecanicamente os frutos.

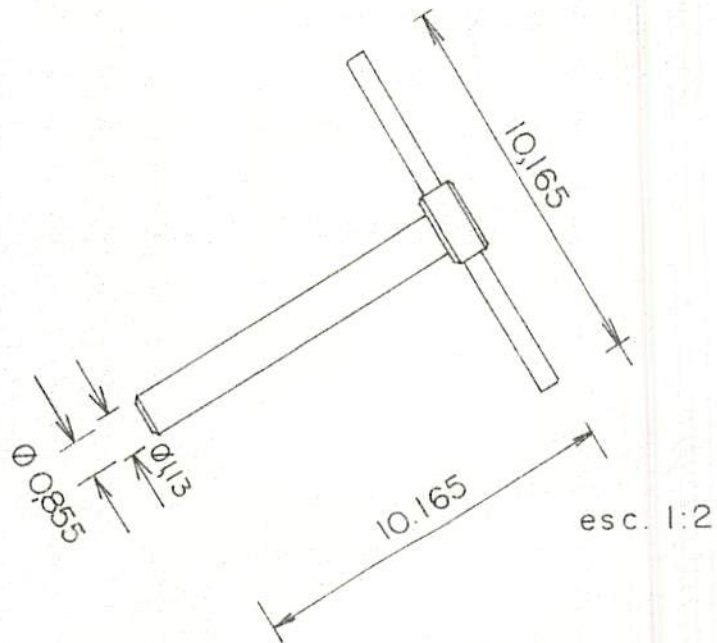
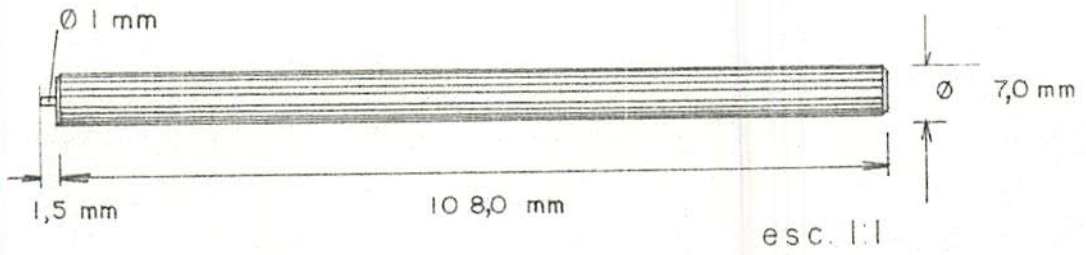


Fig. 2 - Perfurador utilizado para retirar os discos de tecidos dos frutos.

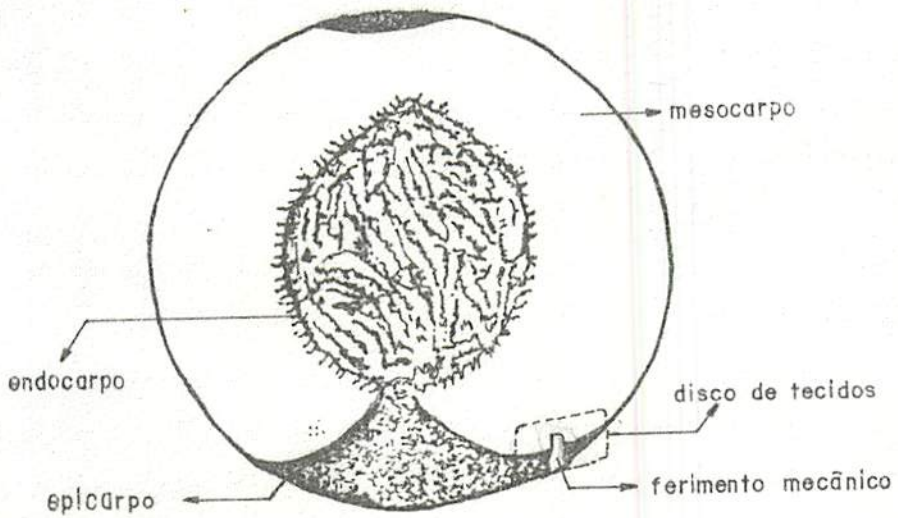


Fig. 3 - Esquema de pêsego representando os tecidos e a profundidade da injúria.

Os ferimentos foram umidecidos com água destilada esteril para evitar o ressecamento dos tecidos.

Os frutos do Experimento 1 (após ferimento e controle) foram armazenados em ambiente com temperatura controlada (20°C) e umidade relativa do ar entre 75-80%, por 0, 24, 48 e 72 horas.

Os frutos do Experimento 2 foram armazenados em estufa B.O.D. a  $6^{\circ}\text{C} \pm 1$  até a realização dos ferimentos mecânicos. Estes foram executados inicialmente nos frutos a serem submetidos a 72 horas de cura e sucessivamente nos de 48, 24 e 0 horas. Após os ferimentos, os frutos eram transferidos para as condições atmosféricas utilizadas no Experimento 1, a fim de processarem a cura. Dessa forma, foi possível inocular simultaneamente todos os frutos dos Grupos 2 e 3 (submetidos aos diferentes tempos de cura) com a mesma suspensão de esporos de Monilínea fructicola.

### 3.6. Estudo da resistência dos frutos a Monilínea fructicola

#### 3.6.1. Fonte de inóculo e técnica de isolamento.

O fungo foi obtido à partir de pêssegos infectados procedentes do supermercado local.

Obteve-se culturas puras do patógeno, através do isolamento de esporos presentes nas lesões dos frutos infectados. Com auxílio de um bisturi, fez-se assepticamente a raspagem superficial dos esporos na área infectada do fruto sobre placas de Petri contendo BDA (batata 200g, dextrose 20g, ágar 18g, água 1000ml). As placas foram incubadas em câmara a 20°C por 7 dias.

No caso da contaminação com outros fungos, fez-se novas repicagens, retirando-se pequenas frações de BDA no local onde aparentemente houvesse Monilínea fructicola. Transferiu-se esses fragmentos para outra placa com BDA. Obteve-se assim culturas puras, conservando-as em placas de Petri contendo BDA a 10 °C

### 3.6.2. Preparo da suspensão de esporos e inoculação dos frutos

Preparou-se a suspensão de esporos colocando-se 10ml de água destilada e esterilizada nas placas de Petri. Com bisturi friccionou-se levemente as colônias obtendo-se uma suspensão na qual adicionou-se Tween 80 (uma gota/100 ml de suspensão) para dispersão mais homogênea dos esporos. Obteve-se a concentração da suspensão através da contagem em hemacitômetro. Através de diluições, ajustou-se a concentração da suspensão para 500 esporos/ml, sendo a mesma utilizada logo após o preparo.

Após cada período de cura dos ferimentos nas condições previamente descritas (Experimento 2, Grupos 2 e 3) os pêssegos foram inoculados assepticamente, em capela de fluxo laminar, utilizando-se uma pipeta automática contendo 0,01ml da suspensão fúngica.

Nos frutos feridos mecanicamente e não inoculados (Grupo 1), os ferimentos receberam água destilada estéril (0,01 ml) para evitar o ressecamento da injúria.

Após a inoculação, os frutos foram mantidos em ambiente com temperatura 20°C e umidade relativa de 75-80% até o final do experimento.



### 3.7. Obtenção e análise dos discos de tecido dos frutos

#### 3.7.1. Obtenção dos discos.

Discos de tecidos com 1 cm de diâmetro e 2 a 3 mm de profundidade foram retirados com auxílio de um perfurador inoxidável (Figura 2) ao redor dos ferimentos nos frutos injuriados e em locais similares nos frutos não feridos (controle), após o mesmo período de tempo.

Foram utilizados os frutos do Experimento 1 (Grupos 1 e 2) após os períodos de 0, 24, 48 e 72 horas de cura de ferimento e os frutos do Experimento 2 - Grupo 3 (feridos, curados e inoculados) 1 e 2 dias após a inoculação

Uma vez retirados, os discos foram imediatamente colocados sob nitrogênio líquido e armazenados em freezer (-18°C) até a realização das análises químicas. Para as análises histoquímicas, uma parte dos discos foi armazenada em solução de formalina-aceto-álcool (FAA) obtida a partir da mistura de álcool etílico 70%, ácido acético glacial e formalina numa proporção de 90:5:5 partes, respectivamente.

#### 3.7.2. Análises histoquímicas.

Os tecidos dos discos foram preparados por fixação em formalina, desaerados utilizando-se (bomba à vácuo) e desidratados. A desidratação foi realizada através de passagens dos discos de tecidos em solução de álcool etílico, com troca da

solução a cada 48 horas, contendo progressivamente concentrações crescentes, variando de 70% até 100%. Em seguida, a cada 24 horas os discos foram colocados consecutivamente em mistura (1:1) de álcool 100% mais álcool t-butílico (clarificação); álcool t-butílico puro; mistura (1:1) de álcool t-butílico e parafina, mantidos a 56°C e finalmente, transferidos para parafina pura, JENSEN (1962); O'BRIAN & McCULLY (1981) e GAHAM (1984). Os tecidos parafinados foram seccionados a 10 µ de espessura utilizando-se micrótomo rotatório Spencer "820" American Optical. As fitas de tecidos parafinados foram fixadas sobre lâminas, desparafinadas, coradas e analisadas em microscópio óptico Amplival através de objetivas 3.2 e 10 e ocular de 40X.

Os compostos fenólicos foram identificados pela coloração verde desenvolvida utilizando-se teste com cloreto férrico, GAHAN (1984) e pela coloração amarelo-marrrom através do nitroso teste, descrito por REEVE (1951).

A suberina foi investigada utilizando-se a o teste Sudan 1V, onde as paredes suberizadas coram-se de vermelho RAWLINS & TAKAHASHI (1952).

A formação da lignina foi investigada através das técnicas de azul O-Toluidina, SAKAI(1973), na qual os tecidos lignificados e suberizados coram-se em azul brilhante, a mistura de fenólicos em azul intenso, as paredes celulares não lignificadas coram-se de roxo, o citoplasma e o RNA em púrpura e o DNA aparece em azul-esverdeado; Azul de Astra, conforme usado por L Krieger citado por BRAGA (1977), na qual as paredes celulares não lignificadas aparecem azul ou azul esverdeado brilhante e as lignificadas em



vermelho; Reação de SCHIFF, pela coloração vermelha JENSEN (1962); Verde iodo-vermelho congo, pela coloração verde DOP & GAUTIE (1928) e Floroglucinol-HCl, pela coloração vermelha FAULKNER & KIMMIS (1975).

### 3.7.3. Análises químicas.

#### A - Extração da parede celular

A parede celular dos discos foi extraída de acordo com a técnica de Nevins et alii citado por BATEMAN et alii (1969). Utilizou-se 2 gramas de material, cujas enzimas foram inativadas com 20 ml de metanol 80% a quente por 10 minutos. Posteriormente, triturou-se a amostra em um homogeneizador de tecidos Tekimar com 20 ml de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0). Após repouso de 30 minutos, centrifugou-se a 2000g por 15 minutos, repetindo-se este procedimento de lavagem por 3 vezes.

Suspendeu-se a amostra em 25 ml de mistura clorofórmio-metanol (1:1), sendo filtrada através de papel Whatman nº 1 em funil de Buchner.

Lavou-se o material retido com uma mistura de metanol clorofórmio e, posteriormente com cerca de 100ml de acetona (cada porção de 25ml). Secou-se a temperatura ambiente.

#### B - Derivatização dos açúcares da parede celular.

A derivatização foi realizada de acordo com a técnica de ALBERSHEIM et alii (1967), através da hidrólise, redução e

acetilação dos açúcares neutros.

A hidrólise foi realizada em 5mg de parede celular, acondicionada em um tubo rosqueado, contendo 0,5ml de ácido trifluoracético (TFA), aquecido em um bloco Heat a 121°C por 1 hora. Em seguida evaporou-se o TFA e adicionou-se 0,5 ml de metanol que também foi evaporado.

A redução processou-se à partir do momento que o tubo foi colocado a temperatura ambiente e adicionou-se 0,15 ml de hidróxido de amônia e 0,15 ml de hidróxido de amônia contendo borohidreto de sódio, mantendo-o à temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente adicionou-se algumas gotas de ácido acético, evaporou a amônia e o ácido e acrescentou-se 0,5 ml de metanol mais ácido acético (9:1), por quatro vezes consecutiva. Adicionou-se 0,5 ml de metanol e secou, sendo esta fase realizada por três vezes.

Efetou-se a acetilação através da adição de 0,15 ml de anidrido acético. Selou e colocou-se o tubo no bloco Heat a 121°C por 3 horas. Secou-se o anidrido acético. Adicionou-se 0,5 ml de metanol e secou, repetindo este processo por duas vezes. O material obtido foi submetido a cromatografia gasosa.

#### C - Determinação

Utilizou-se um cromatógrafo a gás Intralab modelo 3300, com detector de ionização de chama, tendo nitrogênio e hidrogênio como gás de arraste, utilizando-se uma coluna capilar (OVDB 225) como fase estacionária, nas seguintes condições: temperatura da coluna, 210 °C; temperatura do injetor, 250 °C e a do detector

300<sup>o</sup> C. O fluxo do gás de arraste foi de 30 ml/minutos, sendo aplicado à coluna uma pressão de 22 psi, correspondente a 3,75 ml/minutos; o fluxo do hidrogênio foi de 60 ml/minutos e o do ar de 300 ml/minutos. As amostras injetadas foram submetidas ao sistema splitt na proporção 1:90. O cromatógrafo trabalhou com sensibilidade 11 e atenuação 16, conectado a um integrador 4290 Intralab. Os tempos de retenção obtidos foram os seguintes: Ramnose 5,09; Fucose 5,35; Arabinose 6,53; Xilose 8,04; Manose 14,79; Galactose 16,14; Glicose 17,71 e Inositol (padrão interno) 19,15.

### 3.8. Análise Estatística

Para os parâmetros considerados: a) estudo da resistência dos frutos injuriados e curados, à Monilinea fructicola e b) variação nos teores dos açúcares neutros do tecido ferido e curado em relação ao íntegro, foram feitas as análises de variância, utilizando-se delineamentos inteiramente casualizados e teste de Tukey (nível de significância igual a 5%).

Os resultados do ensaio sobre os teores dos açúcares neutros dos tecidos íntegro e ferido em função dos tempos de cura, foram submetidos a análise de regressão (linear, quadrática e cúbica), verificando-se a que melhor ajustava aos dados.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características dos pêssegos 'Biuti' utilizados neste experimento, são apresentadas na Tabela 1. Através destes resultados e dos valores obtidos pela relação sólidos solúveis/acidez, pode-se considerar que os frutos foram colhidos no estágio de maturação comercial. Esta relação é um dos parâmetros comumente utilizados para avaliar o grau de maturação dos frutos, visto que, geralmente, com o avanço da maturação, ocorre um aumento no teor de sólidos solúveis e decréscimo na acidez titulável, Salunkhe et alii citados por TEXEIRA (1979).

##### 4.1. Ensaio histoquímico

Os resultados das observações histoquímicas das paredes celulares dos tecidos submetidos a diferentes tempos de cura de ferimento mecânico, sem e com posterior inoculação com suspensão de esporos de Monilina fructicola são apresentados na Tabela 2

Os compostos fenólicos acumularam-se nos tecidos, após 24 horas de cura, não tendo sido observado nenhuma lignificação ou suberização das paredes das células ao redor do ferimento.

TABELA 1 - Valores médios dos componentes físicos, químicos e físico-químicos da cultivar de pêsego 'Biuti'.

Descrição	Após a colheita	4 dias após a colheita	7 dias após a colheita
Peso do fruto (g)	100.80	94.76	86.41
Peso do caroço (g)	6.74	6.32	6.45
Diâmetro (cm) longitudinal	5.75	5.25	5.07
Diâmetro (cm) transversal	5.66	5.45	5.19
Textura (Newton)	90.75	85.55	73.84
pH	3.50	3.50	3.40
Acidez total titulável (ATT) (% Ac. Cítrico)	0.94	0.89	0.78
Sólidos solúveis totais (%) (SST)	10.50	12.00	12.50
SST/ATT	11.47	13.48	16.02
Polpa/caroço	13.95	13.99	12.08



TABELA 2 - Reações de coloração da parede celular dos tecidos de pêssego 'Biuti' submetidos a diferentes tempos de cura de ferimento mecânico, sem e com posterior inoculação com suspensão de esporos de Monilinea fructicola

Corante (Teste)	Controle *(CNF)	Tempos de cura (horas)										
		Tecido curado				Tecido curado e inoculado **						
		0	24	48	72	24		48		72		
					A	B	A	B	A	B		
Nitroso teste (Fenólicos)	<	<	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Cloreto férrico (Fenólicos)	-	-	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++
Azul de O-Toluidina (Fenólicos)	<	<	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++
Azul de Astra (Lignina)	<	<	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
Verde Iodo/vermelho (Fenólicos) congo	-	<	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Reagente de Schiff (Lignina)	<	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Floroglucinol-HCl (Lignina)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sudan IV (Suberina)	<	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Intensidade de cor:

Reação ausente ou idêntica ao CNF (-)

Reação significativa mas não associada a PC (<)

Reação positiva fraca (±)

\* CNF = controle não ferido

Reação positiva (+)

\*\* A = 1 dia após a inoculação

Reação fortemente positiva (++)

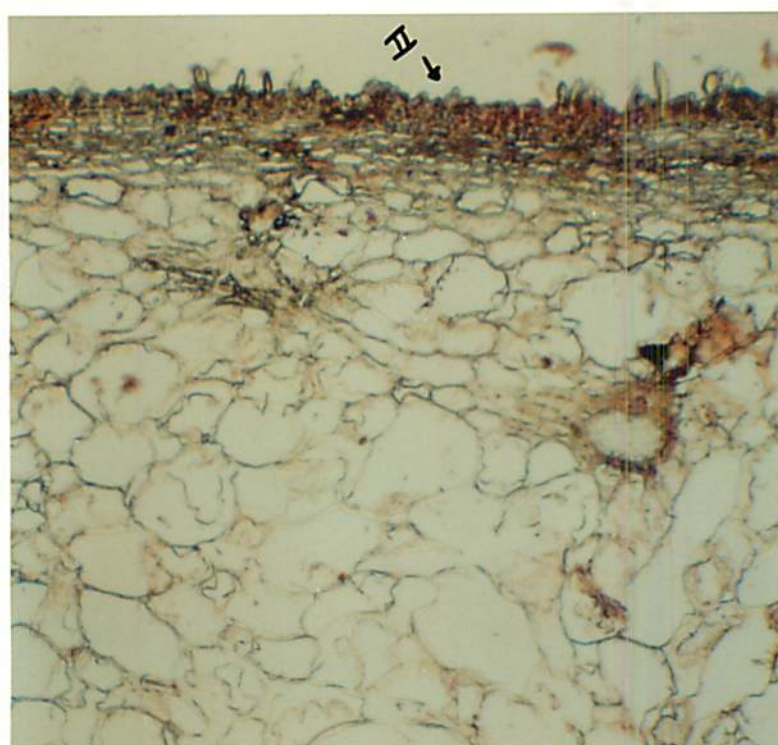
B = 2 dias após a inoculação

A síntese de fenólicos foi mais intensa nas primeiras camadas de células adjacentes ao ferimento, mas pode ser verificado na Figura 4 que após 48 horas de cura, cerca de 9 camadas apresentaram resposta de síntese.

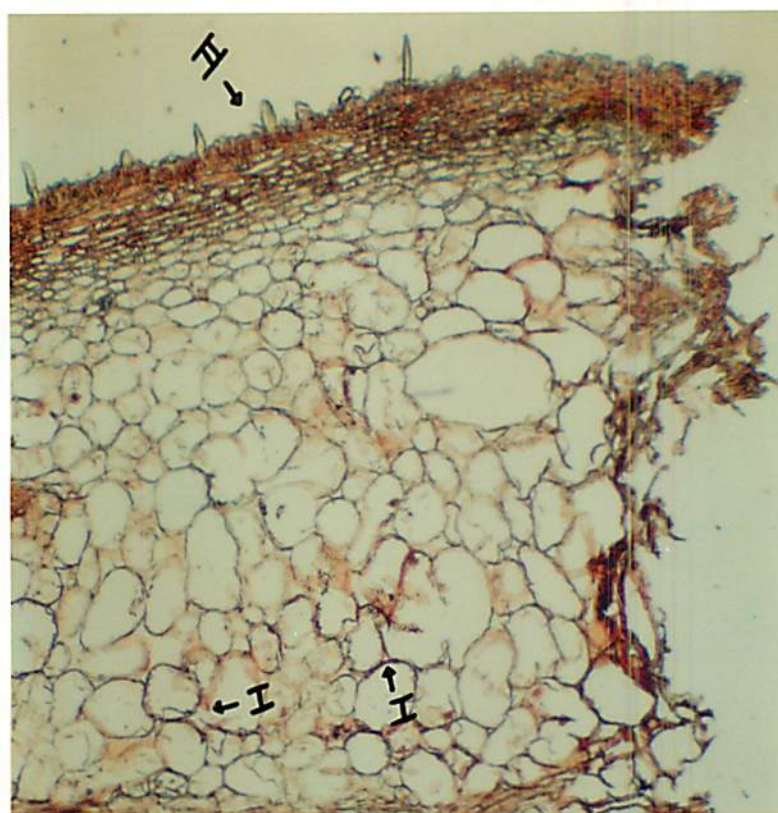
Os compostos fenólicos foram localizados histoquimicamente nas paredes celulares dos tecidos de pêssego Biuti injuriados, e naqueles injuriados e inoculados com suspensão de esporos de Monilínea fructicola, através do Nitroso teste, confirmado pelo teste com Cloreto férrico. Nos tecidos de pêssego 'Biuti' injuriados mecanicamente, a camada de células rompidas foi chamada de camada de ferimento. Tal camada apresentou reação positiva para compostos fenólicos, provavelmente, devido a quebra da integridade celular, o que expôs os substratos à ação de enzimas.

A reação pelo Nitroso teste, nas camadas de células íntegras que circundam o ferimento, foi visível no tecido ferido a partir de 24 horas de cura de ferimento. No tecido ferido e inoculado, a reação foi mais intensa em 24 horas de cura após 2 dias de contato com o fungo (Tabela 2). Os tecidos íntegros (controle) e aqueles injuriados e inoculados com Monilínea fructicola corados pelo Nitroso teste são apresentados na Figura 4, sendo a reação visível através da coloração marrom amarelada, e que não foi observada no tecido não injuriado.

Foi realizado o teste com o Azul de O-toluidina, que segundo SAKAI (1973), permite também a verificação de paredes lignificadas ou suberizadas bem como acúmulo de fenólicos. No tecido injuriado, submetido à cura de ferimento sem e com



A



B

Figura 4 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêssigo pela coloração Nitroso teste: a) tecidos sem injúria (controle); b) tecidos após 48 horas de cura de ferimento (Experimento 2, Grupo 3), 1 dia após a inoculação com suspensão de esporos de *Monilinea fructicola*; indicando: I - Substâncias fenólicas, II - Cutícula. Aumento de 200x

posterior inoculação com esporos, as paredes das células circunvizinhas apresentaram coloração azul acentuada, indicando acúmulo de fenólicos, lignina e ou taninos. No tecido apenas injuriado a reação foi positiva fraca em 24 horas de cura, enquanto que no tecido inoculado, foi fortemente positiva (Tabela 2).

Os resultados do Nitroso teste, Cloreto férrico e do Azul de O-toluidina referentes aos tecidos injuriados e submetidos a cura foram compatíveis com os de TOURINO (1980).

Através da Tabela 2, pode-se verificar que houve uma resposta mais intensa em relação a síntese dos compostos fenólicos nas paredes das células ao redor da injúria, após a inoculação com o fungo Monilina fructicola. Segundo CONDON & KUC (1960), o acúmulo de polifenóis, incluindo flavonóides, ácido cinâmico e derivados, e coumarinas em tecidos imediatamente adjacentes a tecidos injuriados em muitos tipos de materias de plantas é considerado geralmente como dependente da interação tecido vivo e fungos.

Os resultados obtidos por LAKSHMINARAYANA et alii (1987), também confirmam esta interação ao demonstrar que o ataque fúngico, estimulou a produção de fenólicos, taninos e lignina em maçãs maduras Golden Delicious e Granny Smith estocadas a 5 C, ocorrendo a formação de paredes de aposição, principalmente na 4ª e 6ª camadas de células à partir do ferimento.

Uma outra interação hospedeiro-parasita que demonstrou acúmulo de material fenólico nas paredes celulares infectadas, foi a observada por AMPOMAH & FRIEND (1988), que estudaram a resistência do disco de tubérculo de duas cultivares de batata,

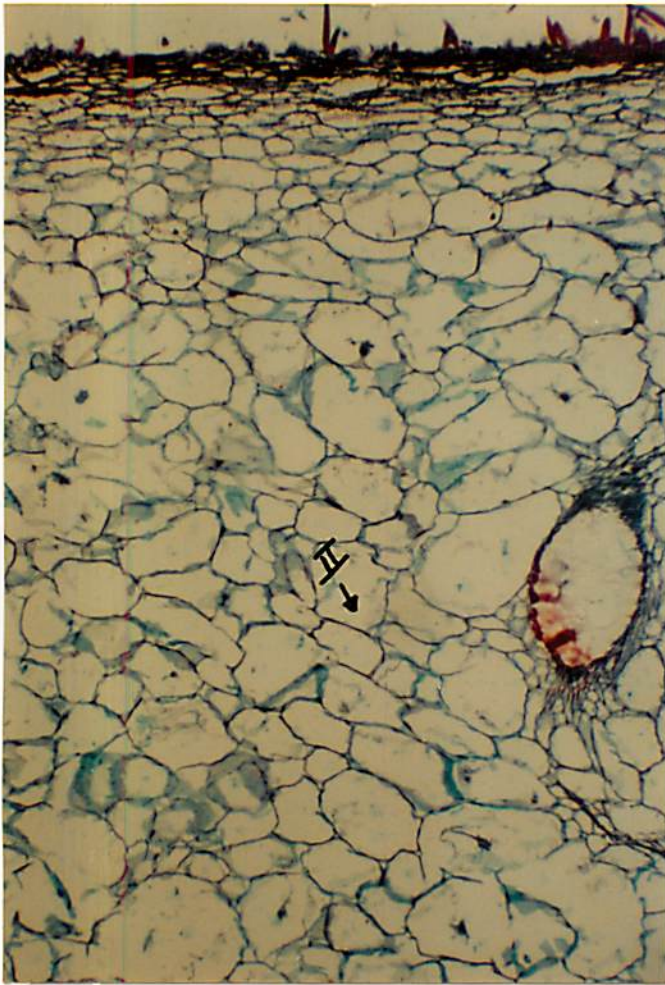
uma resistente (Stormont enterprise) e uma susceptível (King edward) ao Phytophthora infestans e ao Phoma exigua. Esses autores verificaram, através da coloração Azul de o-toluidina que as camadas de células não inoculadas apresentaram uma cor azul-verde menos intensa que as células correspondentes do tecido inoculado, o que está de acordo com o presente trabalho.

O estímulo a produção de fenólicos no tecido infectado é promovido pelos elicitores, que são formados devido a ação das enzimas fúngicas degradativas na parede celular do hospedeiro ou pela ação de enzimas da planta nos constituintes da parede do fungo, dando a célula hospedeira uma injúria contínua.

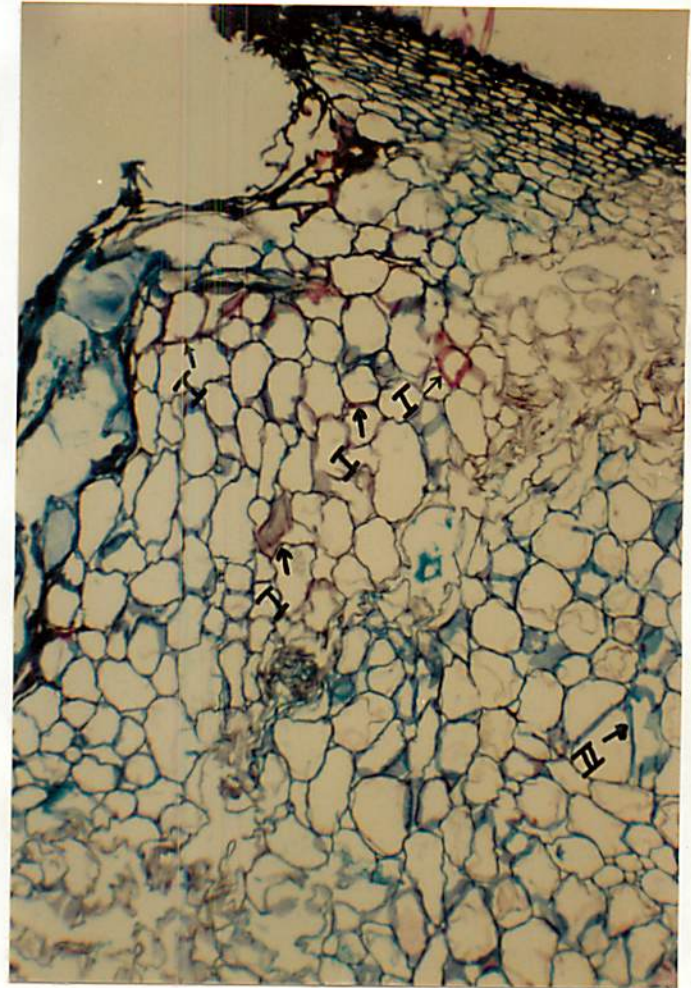
Segundo vários autores BROWN (1978); BAUDOIN & ECKERT (1985); AMPOMAH & FRIEND (1988), esses compostos podem ter atividade fungistática, inibindo o crescimento fungico.

Os detalhes celulares apresentados na Figura 5 e 5A, foram observados através da coloração de Azul de Astra dos tecidos integros, injuriados e inoculados. Através desta coloração e de Verde iodo Vermelho congo, verificou-se em algumas paredes das células ao redor da camada de ferimento, uma reação positiva no tecido após 72 horas de cura. No tecido inoculado, a reação foi fortemente positiva em 24 horas de cura, 1 dia após aplicação do fungo para o Azul de Astra e 2 dias após a aplicação do fungo para o Verde iodo Vermelho congo. Esta reação pode indicar a presença de lignina ou de outros compostos fenólicos, como uma resposta de defesa do fruto ao ferimento e a presença do fungo, visto que no tecido não injuriado tal reação não foi verificada (Tabela 2).





A



C

Figura 5 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêsego pela coloração Azul de Astra: a) tecidos sem injúria; b) tecidos com injúria após 72 horas de cura; indicando: I - Mistura de fenólicos, II - Parede celular não lignificada, III - Elementos lignificados. Aumento de 200x.

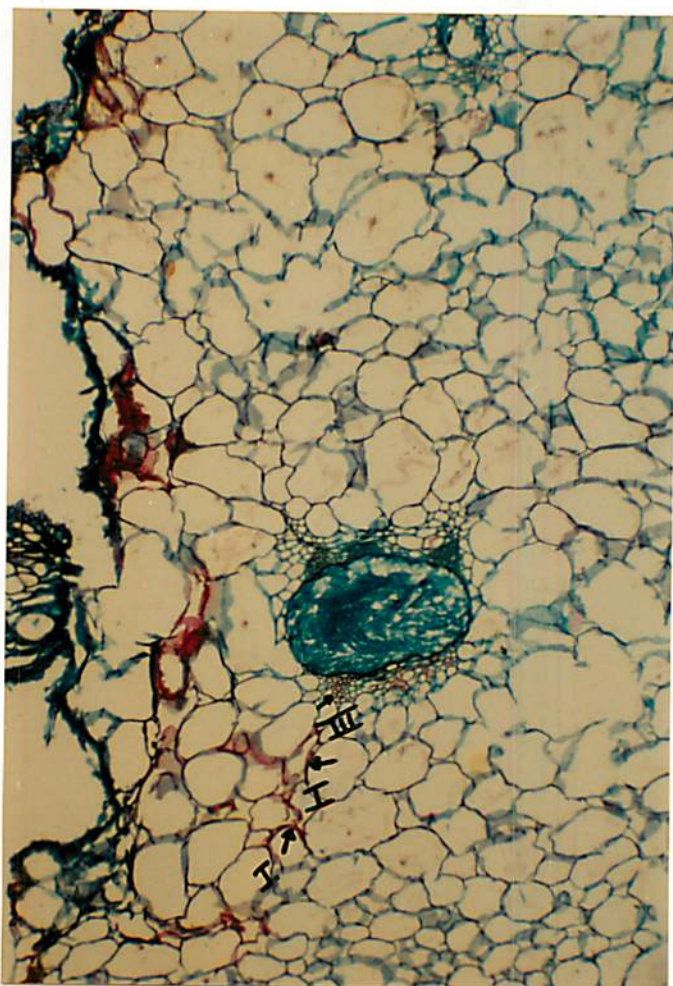


Figura 5A - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de pêsego pela coloração Azul de astra: c) tecido após 72 horas de cura de ferimento (Experimento 2, Grupo 3) 2 dias após a inoculação com suspensão de esporos de Monilinea fructicola; indicando: I - Mistura de fenólicos. Aumento de 200x.

Entretanto, os testes utilizados para investigação da lignina com Floroglucinol-HCl, reação com reagente de Schiff e da suberina com Sudan IV, foram negativos nos tecidos injuriados e injuriados e inoculados. Apesar da reação do reagente de Schiff ter sido fracamente positivo para os tecidos contendo o fungo, não houve confirmação pela reação do Floroglucinol-HCl, sendo esta mais específica pois reage com os grupos finais cinamaldeído da lignina.

Portanto, a coloração desenvolvida pelo Azul de Astra, Azul de O-toluidina e Verde Iodo Vermelho Congo foi, provavelmente, devido a presença de compostos fenólicos precursores da lignina.

Neste ensaio, a não detecção da lignina e suberina nos tecidos injuriados foi compatível com os resultados de de TOURINO (1990).

#### 4.2. Resistência

Apesar dos testes de coloração para a pesquisa de fenólicos terem sido positivos, os frutos feridos submetidos à cura de fermentos e inoculados com a suspensão de esporos de Monilinia fructicola não foram resistentes (Figura 6). Esta baixa resistência pode ser uma característica da própria cultivar ou pode ser resultante das condições utilizadas durante a cura como temperatura de 20 °C, umidade relativa 75-80% e do próprio tempo de cura 24, 48 e 72 horas, que podem não ser ideais, ou mesmo que a concentração dos compostos fenólicos não foi a ideal para exercer o seu poder inibitório.



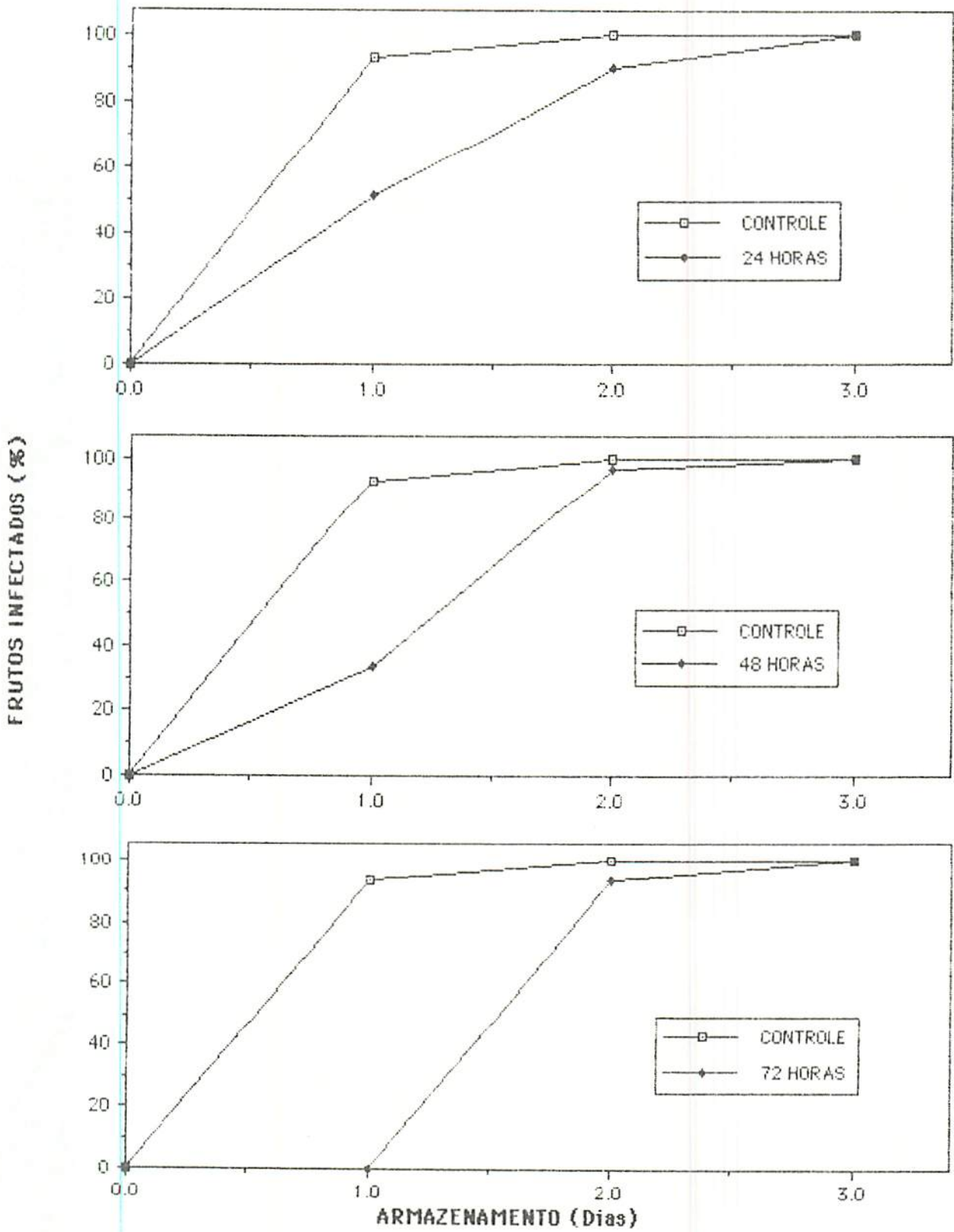


FIGURA 6 - Resistência do Pêssego, cultivar "Biuti" ao ataque de *M. fructícola* submetido à cura de fermentos por diferentes tempos à 20° C e UR 75 - 80%.



NODUE et alii (1982) e BRINDLE et alii (1985), verificaram que os fatores externos como temperatura, umidade relativa, luz e composição de oxigênio e dióxido de carbono afetam a cicatrização e sua relação com a resistência a certos patógenos. A influência dos fatores intrínsecos como cultivar, estágio de desenvolvimento e "deficit" de água, foi observada por WOOD (1967) e BIGGS (1986).

No presente trabalho, foi possível verificar a influência do tempo de cura sobre a resistência do pêssego cultivar 'Biuti' ao fungo Monilina fructicola. No teste de resistência (Figura 6), os frutos curados por 72 horas e posteriormente inoculados, apresentaram menores índices de doença no primeiro dia após a inoculação em relação aos curados por 48, 24 e 0 horas, provavelmente devido ao maior acúmulo de fenólicos que foi observado histoquimicamente (Tabela 2). Este efeito foi observado por BONNAS (1991), que estudando a influência da temperatura e do tempo de cura sobre a resistência de laranja Valência ao Penicillium digitatum, verificou que o efeito do tempo de cura foi bastante significativo para a resistência dos tecidos à infecção, quando realizada por 40 e por 72 horas independente da temperatura de 20 a 25 °C ou de 30 °C.

Os frutos submetidos a cura por 72 horas e posteriormente inoculados, que apresentaram inicialmente os menores índices de doença, também não resistiram ao fungo Monilina fructicola (Figura 6), provavelmente devido a influência da umidade relativa do ambiente e da temperatura a que os pêssegos foram expostos para o processamento da cura. Estes fatores promoveram o amadurecimento dos frutos, conseqüentemente aumento da atividade

das vias glicolíticas e oxidativas, resultando em várias modificações no fruto, principalmente na sua textura devido a solubilização da protopectina das paredes celulares, diminuindo a força coesiva que mantém as células unidas, facilitando assim a atuação das enzimas fúngicas, tornando-a mais disponível como fonte de carbono para o fungo, promovendo a sua penetração e o desenvolvimento da lesão. A influência do estágio de desenvolvimento do vegetal nos componentes de cicatrização foi demonstrado em limão e maçã por SKENE (1981) e BAUDOIN & ECKERT (1985).

A cura de ferida é enzimaticamente controlada, portanto, os processos que a envolvem são sensíveis à temperatura, podendo a mesma ter influenciado diretamente no mecanismo de resistência do pêssigo 'Biuti'.

Foi verificado por BROWN et alii (1978) em citrus que a síntese e o acúmulo de lignina variam com a temperatura, sendo 30 °C a temperatura de boa produção para este polímero, a 33 °C a acumulação não foi evidente e a 25 °C ocorreu apenas um pequeno desenvolvimento. O teor de umidade, segundo os autores, também é crítico para a formação de lignina, sendo que em flavedo de citrus injuriados e mantidos a umidade relativa menor que 70%, houve pequena deposição de material tipo lignina nas paredes celulares deste tecido, e esta deposição provavelmente foi associada a dessecação das células ao redor da injúria. Nos discos de tecidos do pêssigo 'Biuti' esta dessecação foi prevenida pelo umedecimento da injúria com água destilada esterilizada, conforme realizado por TOURINO (1990).

### 4.3. Açúcares neutros da parede celular

Os açúcares neutros não celulósicos da parede celular do tecido íntegro e injuriado mecanicamente do pêssego Biuti, foram analisados por cromatografia gasosa. Em ambos os tecidos o açúcar predominante foi a arabinose, seguido da galactose e xilose (Tabela 3).

A composição dos açúcares neutros variou tanto no tecido íntegro como no tecido injuriado mecanicamente, durante o tempo de armazenamento (Figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14). Resultado da elevada taxa de turnover desses compostos na parede celular, ou seja, os polímeros podem estar sendo degradados, enquanto síntese e deposição de compostos iguais ou similares podem estar ocorrendo concomitantemente, conforme já descrito por LABAVITCH (1981).

Os tecidos injuriados apresentaram maior teor de galactose, rarnose e manose em 72 horas de armazenamento, em relação ao tecido íntegro, conforme a Figura 7.

O aumento da galactose no tecido injuriado iniciou após 52,8 horas de cura, atingindo o máximo em 72 horas (Figura 13). Já o aumento de manose e rarnose processou-se à partir de 36,89 e 32,7 horas de cura respectivamente, atingindo o máximo também em 72 horas (Figuras 8 e 12).

O aumento destes açúcares neutros foi coincidente com o tempo de cura no qual houve maior depósito de fenólicos nos tecidos injuriados. Assim pode-se considerar, que no processo de cura, mais especificamente, com o depósito de fenólicos nas

TABELA 3 - Composição dos açúcares neutros (mg/100 mg de parede celular) da parede celular de pêssego 'Biuti' sem injúria (S/I) e com injúria (C/I), mantidos por 72 horas a 20 °C e 75% UR.

Açúcares neutros	Tempo de cura (horas)							
	0		24		48		72	
	S/I	C/I	S/I	C/I	S/I	C/I	S/I	C/I
Ramnose	0.74	0.87	0.70	0.67	0.84	0.69	0.78	0.97
Fucose	0.43	0.46	0.39	0.46	0.36	0.33	0.44	0.48
Arabinose	10.95	9.71	10.21	10.44	8.18	7.65	10.00	11.52
Xilose	2.67	2.77	2.53	2.28	2.11	1.94	2.50	2.72
Manose	0.83	1.37	0.76	1.04	1.04	0.82	0.94	1.39
Galactose	3.65	4.08	2.50	4.17	3.28	2.38	3.22	4.48
Glicose	1.20	1.04	0.73	0.84	0.83	0.59	0.79	0.85
TOTAL	20.47	20.29	17.57	18.87	16.65	14.38	18.59	22.32



paredes celulares, ocorre paralelamente um aumento de galactose, manose e ramnose. Esta alteração dos açúcares neutros poderia também contribuir para a resistência da parede celular às enzimas fúngicas devido a alteração da especificidade da reação enzima-substrato ou por alteração do meio ambiente do patógeno, conforme verificado por STROBEL (1963); NEVINS et alii (1967); REESE et alii (1968) e ENGLISH & ALBERSHEIM (1969).

A influência da alteração do meio ambiente do patógeno na sua patogenicidade foi demonstrada por MOLINE & GROSS (1984) que estudando o crescimento de 5 fungos patogênicos em monossacarídeos liberados da parede celular, verificaram que o crescimento dos fungos foi estimulado pela glicose ou pela sua combinação com os outros monossacarídeos, e que a germinação de Monilinea fructicola foi completamente inibida por 5 e 50  $\mu$ M de galactose e o crescimento das colônias inibido por ácido galacturônico e xilose. Portanto existem diferenças na habilidade dos fungos patogênicos em utilizar os monossacarídeos liberados da parede celular como fonte de carbono para seu crescimento.

O fungo Monilinea fructicola, produz pectinases que atuam nas substâncias pectínicas da parede celular, diminuindo a força coesiva da mesma, sendo que, o aumento dos açúcares neutros galactose, manose e ramnose nos tecidos do pêssego 'Biuti' injuriados e curados, provavelmente é uma resposta da célula à injúria com o intuito de fortalecer o substrato da ação das enzimas fúngicas.

Esta correlação foi observada no trabalho de GROSS (1984) que trabalhando com fracionamento e caracterização da parede celular de tomate normal "Rutgers" e mutante ("rin" e "nor")

observou que a concentração do açúcar neutro galactose influencia na resistência dos frutos a certas deteriorações por microrganismos pós-colheita. Pois a fruta mutante "rin" e "nor" que é caracterizada pela inabilidade de amadurecer ou amaciar lentamente e por ser menos susceptível a certas deteriorações pós-colheita do que a fruta normal, durante o amadurecimento, perdeu respectivamente 43% e 22% dos seus resíduos de galactose, enquanto, a fruta normal perdeu 71%.

McFEETERS & LOVDAL (1987), também demonstraram que a concentração dos açúcares neutros da parede celular do pepino influencia nas suas propriedades físicas. A concentração dos açúcares da parede celular do pepino foi mais alta no tecido da casca (4 a 5 vezes) do que no tecido do mesocarpo e endocarpo. Portanto, esta alta concentração pode ser um importante fator na determinação da propriedade de barreira no tecido do pepino, podendo ter um grande significado na proteção do pepino intacto contra as enzimas fúngicas. Também foi observado uma correlação positiva entre a concentração total dos açúcares neutros da parede celular e a textura do tecido, indicando uma contribuição da concentração dos açúcares neutros para as propriedades físicas.

A ausência de lignina no tecido de pêssego 'Biuti' injuriado mecanicamente, foi compatível com a composição dos açúcares neutros, de acordo com o trabalho de WALDRON & SELVENDRAN (1990) que estudando a composição da parede celular de diferentes tecidos de aspargo, observaram que tecidos lignificados como elementos do xilema e células esclerênquimas apresentaram

altos níveis de xilose e glicose. Entretanto os teores de xilose e glicose não variaram no tecido de pêssego ferido mecanicamente e armazenado em relação ao tecido íntegro.

Se a planta proporciona ao patógeno uma mistura de açúcares ou polissacarídeos os quais alteram qualitativa e quantitativamente a produção de enzimas degradantes dos polissacarídeos do hospedeiro, isto poderá resultar num desenvolvimento abortivo do patógeno, podendo assim tornar a planta resistente ao mesmo.

ACUCARES NEUTROS  
(mg/100 mg de parede celular)

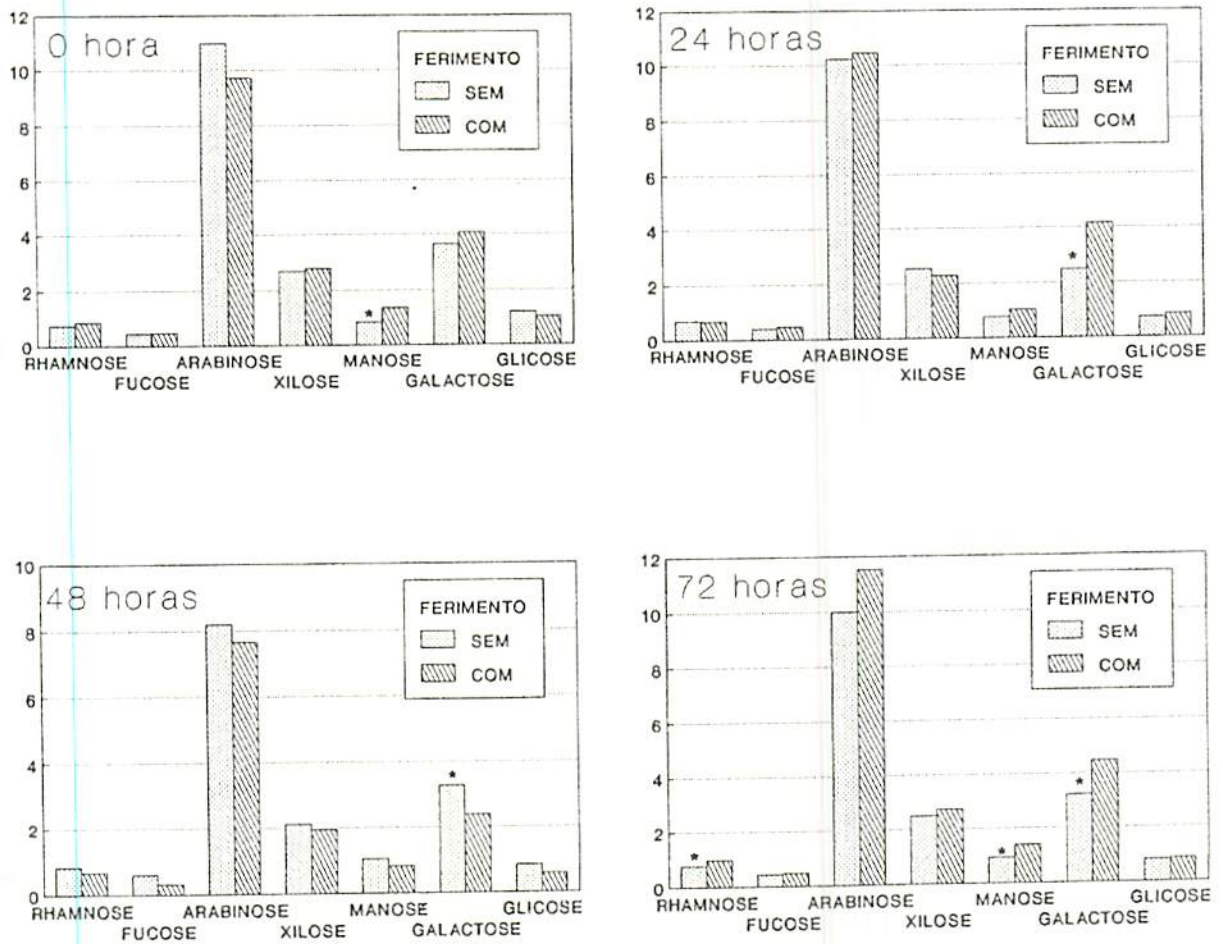


Figura 7 Histograma dos açúcares neutros em discos de pêssgo "Biuti, injuriados mecanicamente ou não, após 0, 24, 48 e 72 horas de cura. (\* diferente por Tukey 5 %).



## 5. CONCLUSOES.

- 1 - Houve acúmulo de fenólicos após 24 horas nas paredes das células ao redor da injúria.
- 2 - Não foi observado acúmulo de lignina ou suberina nas paredes celulares injuriadas.
- 3 - O fungo estimulou uma maior produção de fenólicos nas paredes das células injuriadas. Não houve deposição de lignina ou suberina.
- 4 - Não se verificou resistência da cultivar "Biuti" ao fungo Monilínea fructicola.
- 5 - A alteração dos açúcares neutros, galactose, ramnose e manose, da parede celular, em 72 horas de cura de ferida, foi coincidente com o maior acúmulo de fenólicos.

## 6. RESUMO

Objetivou-se identificar o grau de resistência pós-colheita dos frutos de pessegueiro (Prunus persica, L.) cv. 'Biuti', à podridão parda, causada pelo fungo Monilinia fructicola, utilizando-se métodos histoquímicos (identificação de fenólicos, suberina e lignina) e químicos (açúcares neutros determinados por cromatografia gás-liquido). Os pessegos foram injuriados assepticamente, com auxílio de estilete e submetidos ao processo de cura de ferimento por 24, 48 e 72 horas à temperatura de 20<sup>o</sup> C e umidade relativa do ar entre 75-80%. Posteriormente, foram inoculados no local do ferimento, com uma suspensão de esporos (500 esporos/ml) do patógeno e armazenados nas mesmas condições.

Foram realizadas contagens dos frutos com desenvolvimento de lesões. Após 0, 24, 48 e 72 horas de cura de ferimento, retirou-se os discos de tecidos ao redor das injúrias para os ensaios histoquímicos nas paredes das células adjacentes à injúria e para a determinação dos açúcares neutros isolados da parede celular. Nos frutos feridos e inoculados os discos foram retirados após

24, 48 e 72 horas de cura 1 e 2 dias após a inoculação.

Os resultados demonstraram acúmulo de compostos fenólicos, mas não de compostos tipo lignina ou suberina, principalmente após 48 e 72 horas de cura, sendo este intensificado na presença do fungo. Em relação aos açúcares neutros, houve predominância da arabinose, seguida da galactose e xilose. No tecido injuriado houve aumento da galactose, manose e ramnose após 72 horas de cura. Nas condições realizadas não se verificou resistência da cultivar 'Biuti' ao fungo Monilinea fructicola

## 7. SUMMARY

Post-harvest of peach fruit: Resistance mechanism against the fungus Monilinia fructicola

The aim of this research was to verify the post harvest resistance level of the peach fruit (*Prunus persica*, L) cv. 'Biuti', brownist rottenness, caused by Monilinia fructicola, using histochemical (identification of phenolic, suberine and lignin) and chemical methods (neutral sugar determination by liquid gas chromatography). Peaches were mechanically pinched aseptically, with a special pin and left for healing for 24, 48 and 72 hours at 20 °C temperature and 75-80% relative humidity (RH).

After healing, the fruits were inoculated at injury site, with spores of Monilinia fructicola (500 spores/ml) and held in the same conditions. Fruits that developed lesions were counted.

Discs were taken from wounded tissues without inoculation at, 0, 24, 48 and 72 hours after healing and histochemical and chemical assays were performed. In case of the fruits mechanically



pinched and inoculated, the discs were withdrawn at 24, 48 and 72 hours after healing, 1 and 2 days after inoculation.

Results showed accumulation of phenolic compounds, but not the kind lignin or suberine compounds, mainly after 48 and 72 hours of healing, thus being intensified in the presence of the fungus. About the neutral sugars, there was predominance of the arabinose, followed by galactose and xilose. The mechanical injury increased the galactose, manose and rhamnose levels after 72 hours of healing. I'any was not detected resistance of the cv. 'Biuti' to the fungus Monilinea fructicola in the research.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 01 - AIST, J.R. Papulae and related wound plugs of plant cells. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 14: 145-63, 1976.
- 02 - \_\_\_\_\_. Structural responses as resistance mechanisms. In: BAILEY, J. A., ed. **The dynamic of host defense**. Sydney, Academy Press, 1983. p. 33-7.
- 03 - ALBERSHEIM, P. Biogenesis of the cell wall. In: \_\_\_\_\_. **Plant Biochemistry**. New York, Academic Press, 1965. 298p.
- 04 - \_\_\_\_\_.; JONES, T. M. & ENGLISH, P. D. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 7: 171-84, 1969.
- 05 - \_\_\_\_\_; NEVINS, D.; ENGLISH, P. & KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, 5: 340-5, 1967.

- 06 - AMPOMAN, Y. A. & FRIEND, J. Insoluble phenolic compounds and resistance of potato tuber disc to *Phytophthora infestans* and *Phoma*. *Phytochemistry*, Elmsford, 27(8): 2533-41, July 1988.
- 07 - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. *Official and tentative methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*. 2. ed. Washington, 1970. 205p.
- 08 - BATEMAN, D. F. An induced mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in *Rhizoctonia* infected hypocotyls of bean. *Phytopathology*, St. Paul, 54: 438-45, 1964.
- 09 - \_\_\_\_\_. & LUMSDEN, R. D. Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 55: 734-8, 1965.
- 10 - \_\_\_\_\_ ; VANETTEN, H. D.; ENGLISH, P. D.; NEVINS, D. J. & ALBERSHEIM, P. Susceptibility to enzymatic degradation of cell walls from bean plants resistant and susceptible to *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Plant Physiology*, Washington, 4: 641-64, 1969.

- 11 - BAUDOIN, A. B. A. M. & ECKERT, J. W. Development of resistance against *Geotrichum oadidum* in lemon peel injuries. *Phytopatology*, St. Paul, 75: 174-9, Feb. 1985.
- 12 - BEN-YEHOSHUA, S.; BARAK, E. & SHAPIRO, B. Post harvest curing at high temperatures reduces decay of individually sealed lemons, pomelos, and other citrus fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Mount, 112(4): 658-63, Nov. 1987.
- 13 - BIGGS, A. R. Comparative anatomy and host response of two peach cultivars inoculated with *Leucostoma cinota* and *Leucostoma persoonii*. *Phytopathology*, St. Paul, 76(9): 905-12, 1986a.
- 14 - \_\_\_\_\_. Wound age and infection of peach bark by *Cytospora leucostoma*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 64: 2319-21, 1986b.
- 15 - \_\_\_\_\_ & BRITTON, K. O. Presymptom histopathology of peach trees inoculated with *Botryosphaeria obtusa* and *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology*, St. Paul, 78(8): 1109-18, 1988.
- 16 - \_\_\_\_\_ & CLINE, R. A. Influence of irrigation on wound response in peach bark. *Canadian Journal Plant Pathology*, Ontario, 8: 405-8, 1986.



- 17 - BONNAS, D. S. **Desenvolvimento de resistência pós colheita em laranja "Valência" a *Penicillium digitatum* influenciada pela temperatura e tempo de cura de ferimento.** Lavras. ESAL, 1991. 76p. (TESE MS).
- 18 - BOOTH, R. H. & BURDEN, O. J. Post-harvest losses. In: COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUT. **Plant Pathologist's Pocketbook.** 2. ed. London, 1968. p. 144-60.
- 19 - BOSTOCK, R. M. & MIDDLETON, G. E. Relationship of Wound periderm formation to resistance to ***Ceratocystis fimbriata*** in almond bark. **Phytopathology**, St. Paul, **77**: 1174-80, 1987.
- 20 - \_\_\_\_\_ & STERMER, B. A. Perspectives on Wound healing in resistance to pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, **27**: 343-71, 1989.
- 21 - BRAGA, M. M. N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da campina. **ACTA Anazônica**, Manaus, **7(3)**: Suplemento Julh. 1977.
- 22 - BRETT, C. & WALDRON, K. **Physiology and Biochemistry of plant cell walls.** London, Vawin Hyman, 1990, p. 194.
- 23 - BRINDLE, P. A.; COOLBEAR, T.; KUHN, P. J. & THRELFALL, D. R. An O<sub>2</sub> study of the biosynthesis and metabolism of rishitin. **Phytochemistry**, London, **24(6)**: 1219-22, 1985.

- 24 - BROWN, G. E. Hypersensitive response of orange-colored Robinson tangerines to *colletotrichum gloeosporioides* after ethylene treatment. *Phytopathology*, St. Paul, **68**: 700-6, 1978.
- 25 - \_\_\_\_\_ & BARMORE, C. R. The effect of ethylene on susceptibility of Robson tangerines to Antracnose. *Phytopathology*, St. Paul, **67**: 120-3, 1977.
- 26 - \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Resistance of healed citrus exocarp to penetration by *Penicillium digitatum* *Phytopathology*, St. Paul, **73**(5): 691-4, Dec. 1983.
- 27 - \_\_\_\_\_ ; ISMAIL, M. A. & BARMORE, C. R. Lignification of injuries to citrus fruit and susceptibility to green mold. *Proceeding of the Florida State Horticultural Society*, Deland, **91**: 124-6, 1978.
- 28 - CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SAO PAULO. Primeiro curso de padronização e classificação de produtos hortigranjeiros. São Paulo, 1962. 141 p.
- 29 - COLCLASURE, G. C & YAPP, J. H. Galactose-induced ethylene evolution in mug bean hypocotyls: A possible mechanism for galactose retardation of plant grown. *Physiologia Plantarum*. **37**: 298-302, 1976.

- 30 - CONDON, P. & KUC, J. Isolation of a fungitoxic compound from carrot root tissue inoculated with *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, St. Paul, 50: 267-70, 1960.
- 31 - COOPER, R. M. The mechanisms and Significance of enzymatic degradation of host cell walls by parasites. In: CALLOW, J. A., ed. *Biochemical Plant Pathology*. chichester, John Wiley & Sons, 1983. cap. 7, p. 101-35.
- 32 - CRUICKSHANK, I.A.M & PERRIN, D.R. Pathological function of phenolic compounds in plants. In: HARBORNE, J.D., ed. *Biochemistry of phenolic compounds*. New York, Academic Press, 1964. 511p.
- 33 - DARVILL, A. G. & ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors - A defense against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 35: 243-75, 1984.
- 34 - DEKAZOS, E. D. Effects of postharvest treatments of ripening and quality of Babygold 7 Peaches. *Hortscience*, Alexandria, 20(2): 240-2, 1985.
- 35 - DELMER, D. P. Cellulose biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 38: 259-90, 1987.
- 36 - DOP, P. & GAUTIE, A. *Manuel de Technique botanique*. Paris, J. Lamarre editeur, 1928. 532 p.

- 37 - ECKERT, J. W. Control of postharvest diseases In: SIEGEL, M. R. & STSTER, H. D., eds. **Antifungal compounds**. Marcel Decker, 1977. V. 1, 600 p.
- 38 - ENGLISH, P. D. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. I.A. Correlation between a galactosidase production and Virulence. **Plant Physiology**, Washington, 44: 217-24, 1969.
- 39 - ERICSSON, M. C. & ELBEIN, A. D. Biosynthesis of cell wall polissacharides and glycoproteins In: STUMPF, P. K. & CONN, E. E., ed. **The Biochemistry of Plants**. New York, Academic Press, 1980. V. 3. 589p.
- 40 - ESKIN, N. A. M. **Plant pigments, flavors and textures - the chemistry and biochemistry of select compounds**. New York, Academic Press, 1979. 219 p.
- 41 - FAULKNER, G. & KIMMIS, W. C. Staining reactions of the tissue bordering lesions induced by wounding tobacco Mosaic Virus and Tobacco Necrosis Virus in beans. **Phytopathology**, St. Paul, 65: 1396-400, 1975.
- 42 - FERREIRA, A. A. **Estudo da Viabilidade técnico-econômica de fruticultura de clima temperado do Estado de Minas Gerais**. Viçosa, UFV, 1976. 128 p. (Tese MS).



- 43 - FLEURIET, A. & DELOIRE, A. Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrisation des fruits de tomate blesses. *Zeitschrift für pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 107: 259-68, 1982.
- 44 - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - **FAO production yearbook - 1987**. Roma, 1987. V. 41, n. 82, p. 212.
- 45 - FRIEND, J. Biochemistry of plant pathogen In: NORTHCOTE, D. H., ed. **Plant Biochemistry II**. Baltimore, University Park Press, 1977. V. 15, 262 p.
- 46 - FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, 37: 165-86, 1986.
- 47 - GAHAM, P. S. **Plant histochemistry and cytochemistry**. New York, Academic Press, 1984. 301 p.
- 48 - GOLOMB, A.; BEN-YEOSHUA, S. & SARIG, U. Y. High density polyethylene wrap improves Wound healing and lengthens shelf life of mechanically harvested grapefruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount, 109(2): 155-9, Feb. 1984.
- 48 - FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, 37: 165-86, 1986.

- 49 - GOODWIN, T. W. & MERCER, E. I. Structure and function of the plant cell. In: \_\_\_\_\_. **Introduction to plant biochemistry**. Oxford, Pergamon Press, 1983. Cap. 3, p. 18-54.
- 50 - GOTH, R. W. & ZAUMEYER, W. J. Reactions of bean varieties to four races of anthracnose **Plant Disease Reporter**, Washington, **49**(10): 815-8, 1965.
- 51 - GROSS, K. C. Fractionation and partial characterization of cell walls from normal and non-ripening mutant tomato fruit. **Plant Physiology**, Washington, **82**: 25-32, 1984.
- 52 - \_\_\_\_\_ & MOLINE, H. E. Growth of two fungal pathogens on isolated cell wall and polysaccharide fractions from tomato fruit. **Physiology and Biochemistry**, Kiev, **78**(6): 573-6, 1986.
- 53 - \_\_\_\_\_ & SALTVEIT Jr, M. E. Galactose concentration and metabolism in pericarp tissue from normal and non-ripening tomato fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount, **107**(2): 328-30, 1982.
- 54 - HAMMERSCHMIDT, R. Rapid deposition of lignin in potato tuber tissue as a response to fungi non-pathogenic on potato. **Physiological Plant Pathology**, London, **24**: 33-42, 1984.

- 55 - \_\_\_\_\_ & KUE, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance of cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, 20:61-71, 1982.
- 56 - HANCOCK, J. G.; MILLAR, R. L. & LORBEER, J. W. Pectolytic and Cellulolytic enzymes produced by **Botrytis allii**, **Botrytis cinerea** and **Botrytis suquamosa** in vitro and in vivo. **Phytopathology**, St. Paul, 54: 828-31, 1964.
- 57 - HEATH, M. C. Hipersensitivity, the cause or the consequence of rust resistance? -letter to the editor. **Phytopathology**, St. Paul, 66: 935-6, 1976.
- 58 - HERSHENHORN, J. S. M. & BARASH, I. Polygalacturonases associated with infection of valencia orange by **Penicillium italicum**. **Physiology and Biochemistry**, Kiev, 80(12): 1374-6, 1990.
- 59 - HORTON, J. C. & KEEN, N T. Sugar repression of endopolygalacturonase and cellulase synthesis during pathogenesis by **Pyrenochaeta terrestris** as a resistance mechanism in onion pink root. **Phytopathology**, St. Paul, 56: 908-16, 1966.
- 60 - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas e técnicas de métodos físicos e químicos de alimentos. In: \_\_\_\_\_. **Normas de qualidade para alimentos**. São Paulo, 1985. n. 1, p. 10-3.



- 61 - ISMAIL, M. A. & BROWN, G. E. Phenolic content during healing of "valencia" orange peel under high humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Mount, 100(3): 249-51, Mar. 1975.
- 62 - JENSEN, W. A. Carbohydrates and cell wall Constituents. In: JENSEN, W. A. *Botanical histochemistry*, San Francisco, W. H. Freeman, 1962. p. 198-206.
- 63 - KEEN, N. T. & HORTON, J. C. Induction and repression of endopolygalacturonase Synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, 12: 443-53, 1966.
- 64 - KOLATTUKUDY, P. E. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 62(12): 2918-33, 1984.
- 65 - KOUKOL, J. & CONN, E. E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 236(10): 2692-8, 1961.
- 66 - KUC, J. Phytoalexins. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 10: 207-32, 1972.
- 67 - LABAVITCH, J. M. Cell wall turnover in plant development. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 32: 385-406, 1981.



- 68 - LAKSHMINARYANA, S.; SOMMER, N. F.; POLITO, V. & FORTAGLE, R. J. Development of resistance to infections by *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in Wounds of mature apple fruits. *Phytopathology*, St. Paul, 77: 1964-78, 1987.
- 69 - LAMB, C. J. Effect of competitive inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase on the levels of phenylpropanoid enzymes in *Solanum tuberosum*. *Plant Cell and Environment*, Oxford, 5: 471-5, 1982.
- 70 - LAMPORT, D. T. A. Cell wall metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 21: 235-70, 1970.
- 71 - LEWIS, N. G. & YAMATO, E. Lignin: occurrence, biogenises and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 41: 455-96, 1990.
- 72 - McFEERTS, R. F. & LOVDAL, L. A. Sugar composition of cucumber cell walls during fruit development. *Journal of Food Science*, Chicago, 52(4): 996-1001, 1987.
- 73 - MARETZKI, A & THOM, M. Characteristics of a galactose-adapted sugar cane cell line grown in suspension culture. *Plant Physiology*, Washington, 61: 544-8, 1978.

- 74 - MELFORD, A. J. & PRAKASH, M. Dey Post-harvest changes in fruit cell walls. **Advances in Food Research**, New York, 30: 168-80, 1986.
- 75 - MIREKU, E. & WILKES, J. Production of phenols in the sapwood of *Eucalyptus maculata* after Wounding and infection. **European Journal for Pathology**. 18: 121-7, 1988.
- 76 - MOLINE, H. E & GROSS, K. C. Growth of five pathogenic fungi on cell wall-related monosaccharides. **Plant Science Letters**, Elsevier, 33: 15-21, 1984.
- 77 - MORRISON, I. M. Hydrolysis of plant cell walls With trifluoroacetic acid. **Phytochemistry**, London, 27(4): 1097-100, 1988.
- 78 - NEVINS, D. J.; ENGLISH, P. D. & ALBERSHEIM, P. Changes in cell walls polysaccharides associated With growth. **Plant Physiology**, Washington, 43: 914-22, 1968.
- 79 - \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_.The specific nature of plant cell wall polysaccharides, **Plant Physiology**. Washington, 42: 900-06, 1967.
- 80 - NNODUE, E. C.; HARRISON, M. D. & PARKER, R. V. The effect of temperature and relative humidity on Wound healing and infection of potato tubers by *Alternaria solani*. **American potato Journal**, Washington, 59: 297-311, 1982.

- 81 - O'BRIAN, T. P. & McCULLY, M. E. **The Study of Plant Structure**; principles and selected methods. Termarcarpi, Pty Melboure, 1981. 1000 p.
- 82 - PERSON, C. Gene-for-gene relationships in host: parasite systems. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, 37:1101-30, 1959.
- 83 - RAWLINS, T. E. & TAKAHASHI, W. N. **Techniques of plant histochemistry and virology**. Milbrae, The National Press, 1952. 125 p.
- 84 - REESE, E. T.; MAGUIRE, A. H. & PARRISH, F. W. Glucosidases and exo-glucanases. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, 46: 25-36, 1968.
- 85 - REEVE, R. M. Histochemical testes for polyphenols in plant tissues. **Stain Technology**, Baltimore, 26(2): 91-6, Apr. 1951.
- 86 - RIDE, J. P. & BARBER, M. S. The effects of various treatments on induced lignification and the resistance of Wheat to fungi. **Physiological molecular Plant Pathology**, London, 31: 349-60, 1987.
- 87 - ROMEIRO, R. S. **Fundamentos de fisiologia do parasitismo em fitopatologia**. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 1987. 31 p.

- 88 - SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin emebbed plant material using Toluidine Blue O. **Stain Tecohnology**, Baltimore, 48: 247-9, 1973.
- 89 - SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Programa paulista de fruticultura de clima temperado**. São Paulo, 1983. 96 p.
- 90 - SKENE, D. S. Wound healing apple fruits: the anatomical response of cox's orange Pippin at different stages of development. **Journal of Horticultural Science**, London, 56(2): 145-53, 1981.
- 91 - SMITH, B. G. & RUBERY, P. H. The effects of infection by **Phytophthora infestans** on the control of phenylpropanoid metabolissm in Wounded potato tissue. **Planta**, Berlin, 151: 535-40, 1981.
- 92 - SPOTTS, R. A & CHEN, P. M. Prestorage heat treatments for control of decay of pear fruit. **Phytopathology**, St. Paul, 77(11): 1578-82, 1987.
- 93 - STAAGHELLINI, M. E. & ARAGAKI, M. Relation of periderm formation and callose deposition to antracnose resistance in papaya fruit. **Phytopathology**, St. Paul, 56: 444-59, 1966.



- 94 - STROBEL, G. A. A Xylanase system produced by *Diplodia Viticola*. *Phytopathology*, St. Paul, 53: 592-96, 1963.
- 95 - STUMPF, M. A. & HEATH, M. C. Cytological studies of the interactions between the cowpea rust fungus and selection-depleted French bean plants. *Physiological plant pathology*, London, 27: 369-85, 1985.
- 96 - TEIXEIRA, M. C. R. **Parâmetros físicos e químicos de frutos de 10 variedades de pessegueiros** (*Prunus persica* (L) Batch). Lavras, ESAL, 1979. 142p. (Tese MS).
- 97 - TOURINO, M. C. C. **Injúria mecânica em tecidos dos frutos de duas cultivares de pêssegos** (*Prunus persica* (L) Batch): **Mecanismos de cura do ferimento**. Lavras. ESAL, 1990. 83p. (Tese MS).
- 98 - VANCE, C. P.; KIRK, T. K. & SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 18: 259-88, 1980.
- 99 - WAGGONER, P. E. & DIMOND, A. E. Production and role of extracellular pectic enzymes of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, St. Paul, 45: 79-87, 1955.

- 100- WALDRON, K. W. & SELVENDRAN, R. R. Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 80: 568-75, 1990.
- 101- WIGGINTON, M. J. Effects of temperature, oxygen, tension, and relative humidity on the Wound healing process in the potato tuber. *Potato Research*, Wageningen, 17: 200-14, 1974.
- 102- WOOD, R. K. S. *Physiological plant pathology*. Oxford, Black Well Scientific Publications, 1967. 570 p.

**APENDICE**

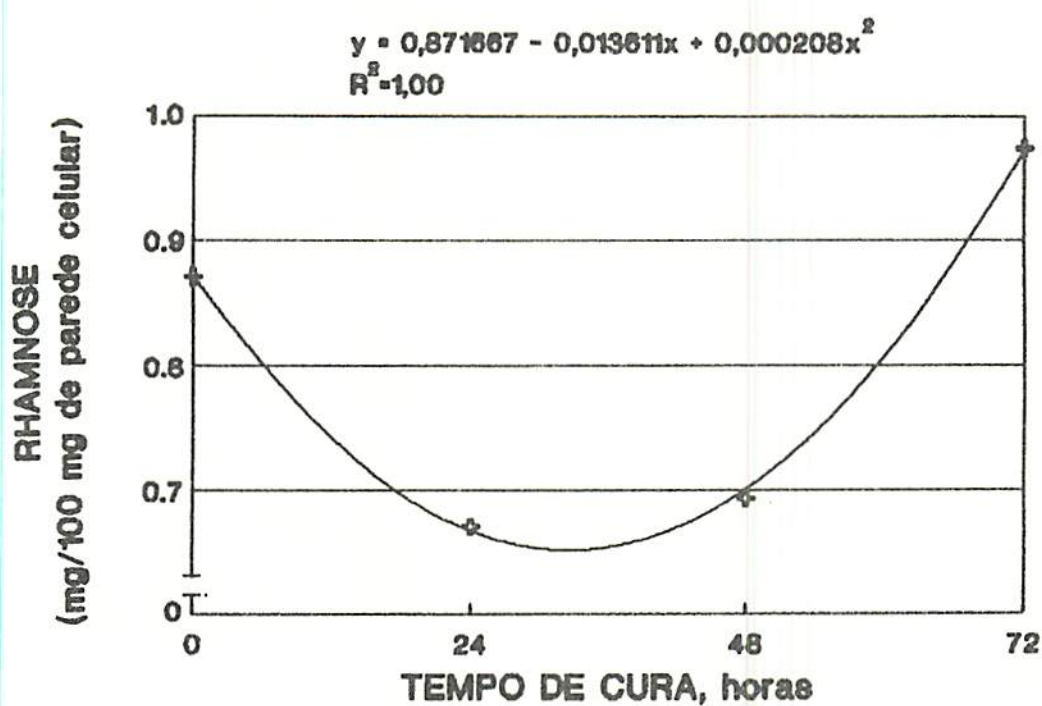


Figura 08 - Equação e curva de regressão de ramnose em discos de tecidos de pêssago "Biuti" injuriados mecanicamente em função do tempo de cura.

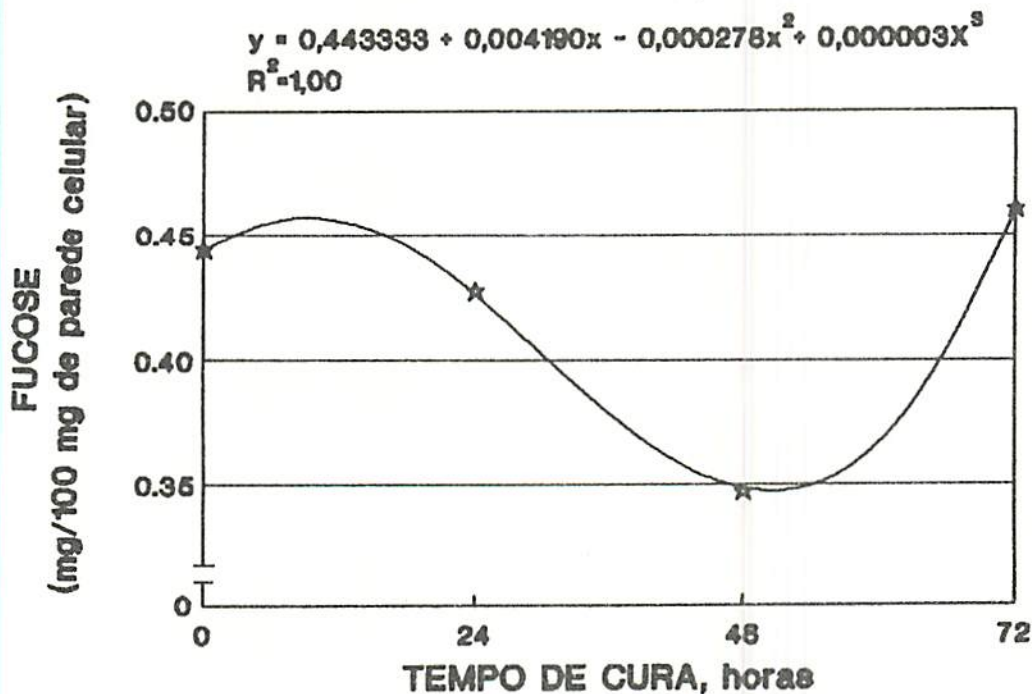


Figura 09 - Equação e curva de regressão dos valores médios de fucose em discos de tecido de pêssago "Biuti" injuriados e não injuriados em função do tempo de cura.



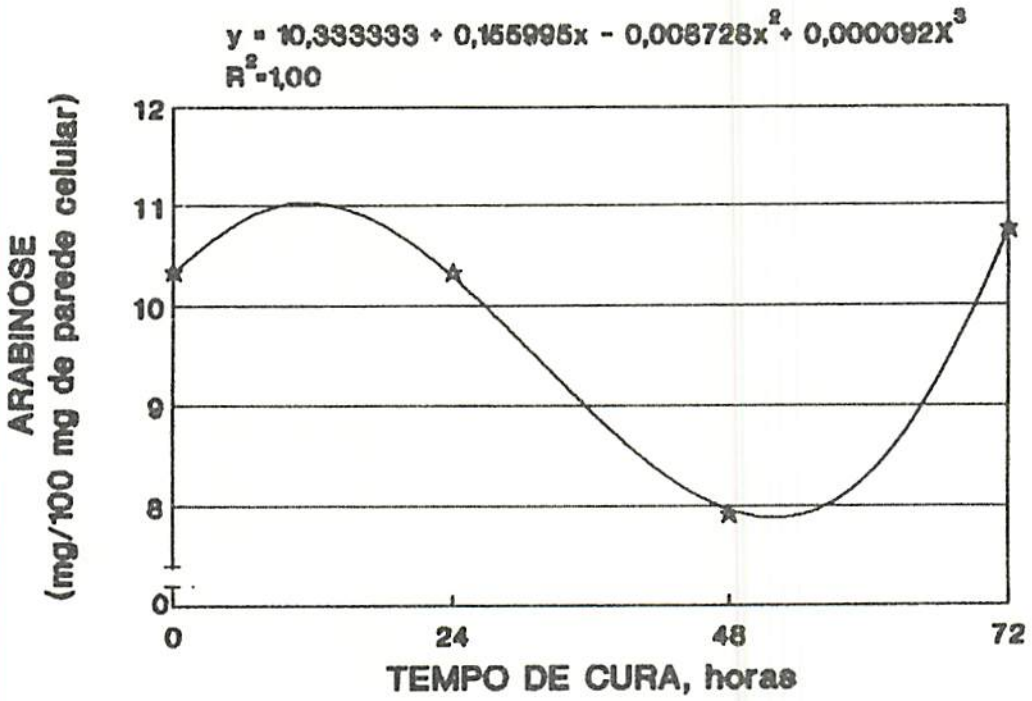


Figura 10 - Equação e curva de regressão dos valores médios de arabinose em discos de tecido de pêsssego "Biuti" injuriados e ão injuriados, em função do tempo de cura.

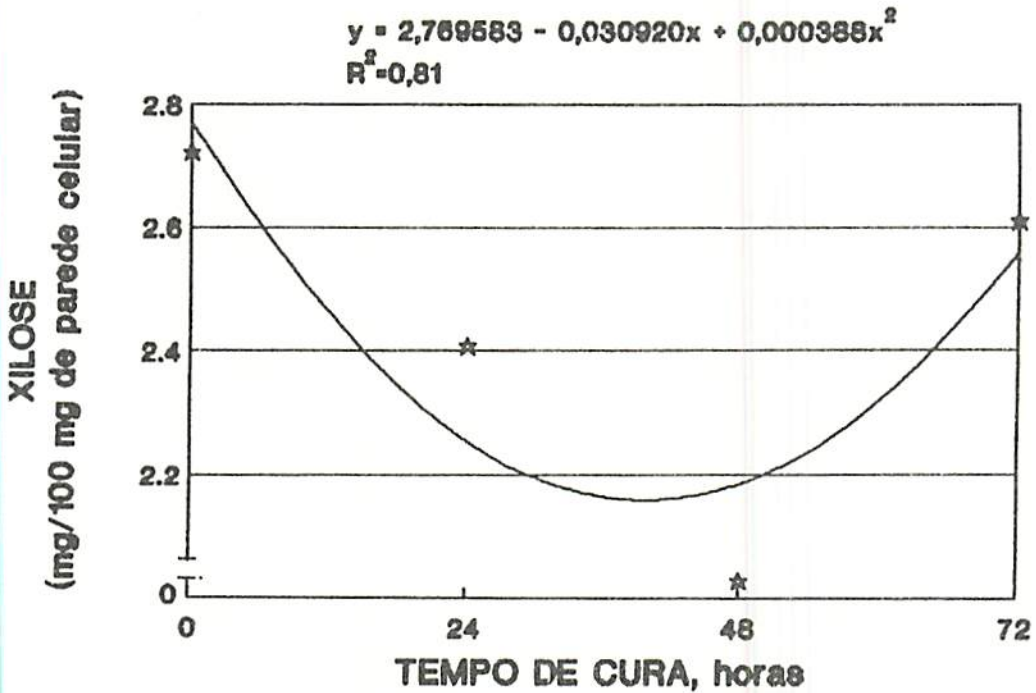


Figura 11 - Equação e curva de regressão dos valores médios de xilose em discos de tecido de pêsssego "Biuti" injuriados e não injuriados em função do tempo de cura.

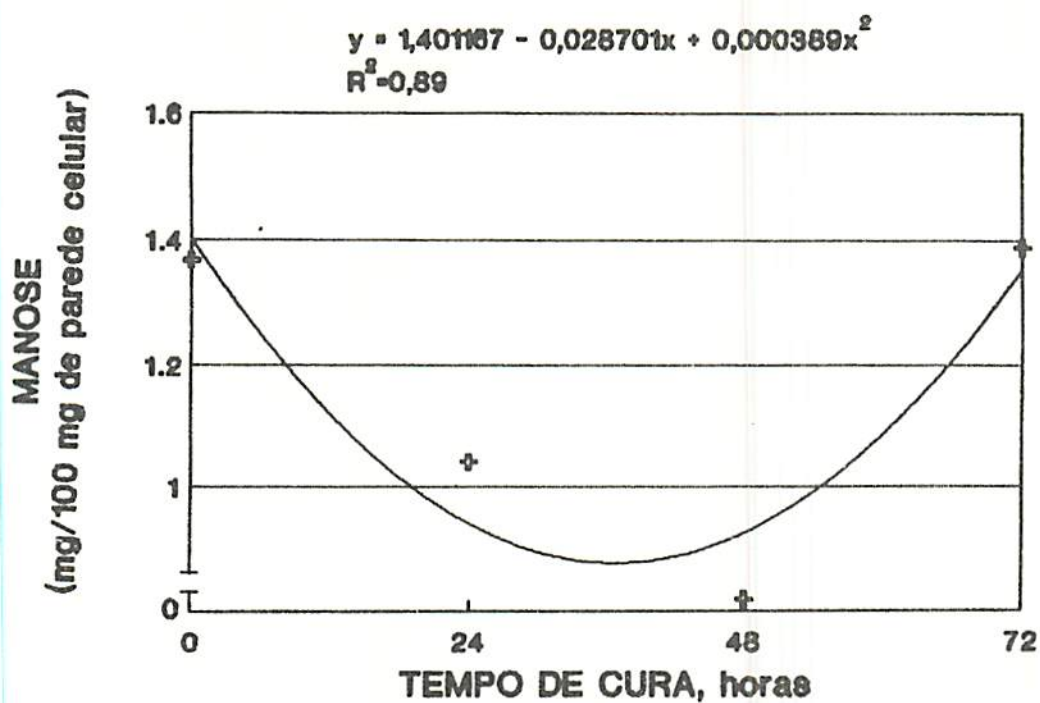


Figura 12 - Equação e curva de regressão de manose em discos de tecidos de pêssgo "Biuti" injuriados mecanicamente em função do tempo de cura.

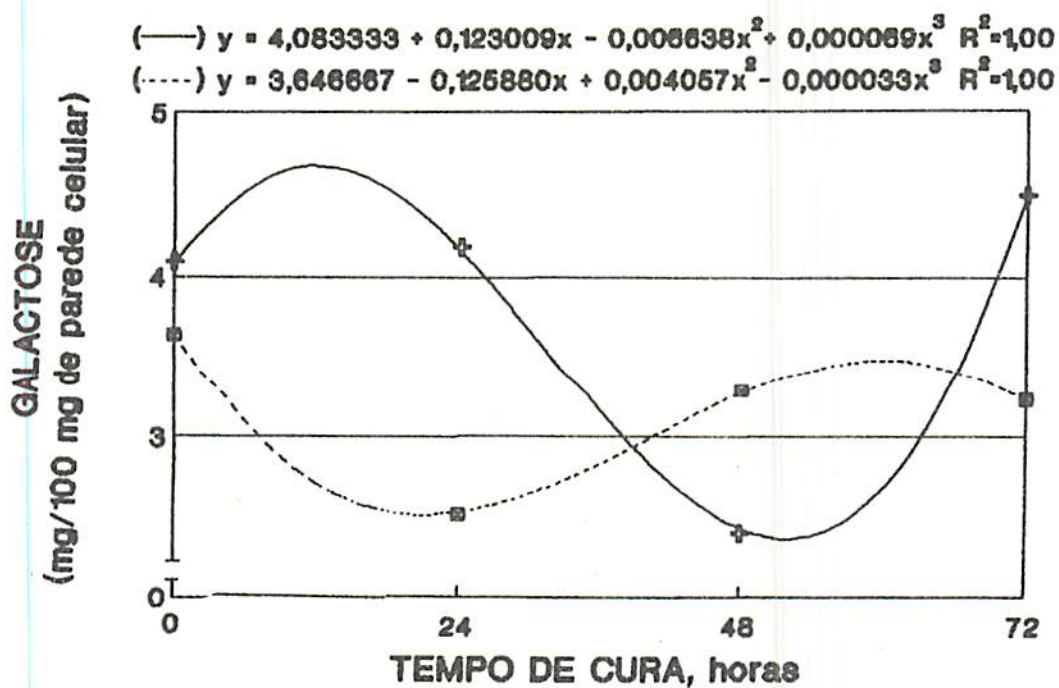


Figura 13 - Equações e curvas de regressão de galactose em discos de tecidos de pêssgo "Biuti" em função do tempo de cura. A) [ — ] Injuriados mecanicamente; B) [ ..... ] Sem injúria.

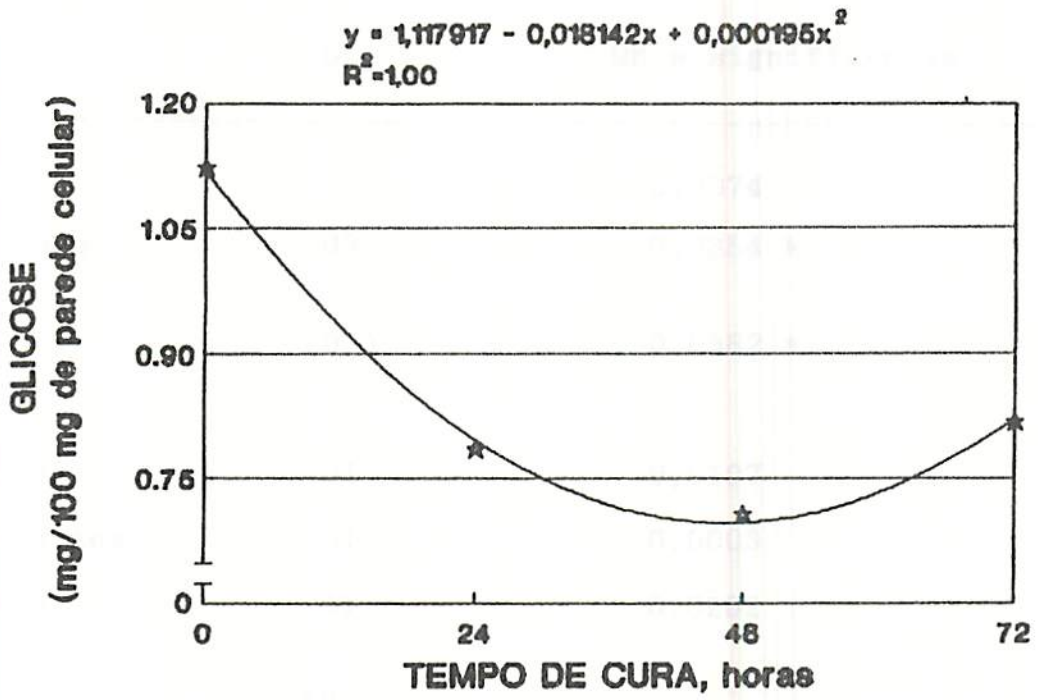


Figura 14 - Equação e curva de regressão dos valores médios de glicose em discos de tecido de pêssago "Biuti" injuriados e não injuriados em função do tempo de cura.

Quadro 1. Análise de variância para ramnose, estudando o efeito dos tempos de cura em tecidos de pêssego cultivar 'Biuti'.

Causas de variação	GL	QM e significancia
Injúria	01	0,0074
Inj x tempo	03	0,0354 *
Tempo	(03)	0,0382 *
A <sub>1</sub>		
R. linear	01	0,0107
R. Quadrática	01	0,0003
R. cúbica	01	0,0202
Tempo	(03)	
A <sub>2</sub>		
R. linear	01	0,0167
R. quadrática	01	0,1728 **
R. cúbica	01	0,0002
Residuo	16	0,0092
CV (%)	12,23	

A - Frutos sem injúria mecânica

A<sub>1</sub> - Frutos com injúria mecânica

A<sub>2</sub>

\* significativo ao nível de 5% pelo teste F

\*\* significativo ao nível de 1% pelo teste F..



Quadro 2. Análise de variância para fucose, estudando o efeito dos tempos de cura em tecidos de pêsego cultivar 'Biuti'.

Causas de variação	GL	QM e significância
Injúria	01	0,0048
Inj x tempo	03	0,0030
Tempo	(03)	0,0151 *
R. linear	01	0,0003
R. Quadrática	01	0,0254 **
R. cúbica	01	0,0198 **
Residuo	16	0,0021
CV (%)	10,93	

\* significativo ao nível de 5% pelo teste F

\*\* significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Quadro 3. Análise de variância para arabinose, estudando o efeito dos tempos de cura em tecidos de pêsego cultivar 'Biuti'.

Causas de variação	GL	QM e significância
Injúria	01	0,0002
Inj x tempo	03	2,1115
Tempo	(03)	10,0368 *
R. linear	01	0,4048
R. Quadrática	01	12,1410 *
R. cúbica	01	17,5644 **
Residuo	16	2,3944
CV (%)	15,74	

\* significativo ao nível de 5% pelo teste F

\*\* significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Quadro 4. Análise de variância para xilose, estudando o efeito dos tempos de cura em tecidos de pêssego cultivar 'Biuti'.

Causas de variação	GL	QM e significância
Injúria	01	0,0051
Inj x tempo	03	0,0744
Tempo	(03)	0,5557 *
R. linear	01	0,1505
R. Quadrática	01	1,2015 **
R. cúbica	01	0,3152
Residuo	16	0,1075
CV (%)	13,44	

\* significativo ao nível de 5% pelo teste F

\*\* significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Quadro 5. Análise de variância para manose, estudando o efeito dos tempos de cura em tecidos de pêsego cultivar 'Biuti'.

Causas de variação	GL	QM e significância
Injúria	01	0,4030 **
Inj x tempo	03	0,1746 **
Tempo	(03)	0,0987 *
A 1		
R. linear	01	0,0602
R. Quadrática	01	0,0008
R. cúbica	01	0,0807
Tempo	(03)	
A . 2		
R. linear	01	0,0040
R. quadrática	01	0,6030 **
R. cúbica	01	0,0714
Residuo	16	0,0294
CV (%)	16,76	

A - Frutos sem injúria mecânica

1

A - Frutos com injúria mecânica

2

\* significativo ao nível de 5% pelo teste F

\*\* significativo ao nível de 1% pelo teste F..



Quadro 6. Análise de variância para galactose, estudando o efeito dos tempos de cura em tecidos de pêssego cultivar 'Biuti'.

Causas de variação	GL	QM e significância
Injúria	01	2,2817 **
Inj x tempo	03	1,9208 **
Tempo	(03)	1,4530 **
A 1		
R. linear	01	0,0365
R. Quadrática	01	0,8856 *
R. cúbica	01	1,1371 *
Tempo	(03)	
A . 2		
R. linear	01	0,0540
R. quadrática	01	3,0200 **
R. cúbica	01	4,9882 **
Residuo	16	0,1574
CV (%)	11,43	

A - Frutos sem injúria mecânica

1

A - Frutos com injúria mecânica

2

\* significativo ao nível de 5% pelo teste F

\*\* significativo ao nível de 1% pelo teste F..

Quadro 7. Analise de variancia para glicose, estudando o efeito dos tempos de cura em tecidos de pêssego cultivar 'Biuti'.

Causas de variação	GL	QM e significância
Injúria	01	0,0210
Inj x tempo	03	0,0426
Tempo	(03)	0,1994 *
R. linear	01	0,2950 **
R. Quadrática	01	0,3015 **
R. cúbica	01	0,0017
Residuo	16	0,0159
CV (%)	14,72	

\* significativo ao nível de 5% pelo teste F

\*\* significativo ao nível de 1% pelo teste F.

QUADRO 8. Análise de variância para porcentagem de frutos que desenvolveram doença, inoculados com Monilinea fructicola após injúria seguida de diferentes tempos de cura.

Causas de variação	GL	QM
Dias	02	11542,9544 **
Tratamento	03	1706,7861 **
DXT	06	1430,1107 **
Trat: D(1)	03	4533,6584 **
Trat: D(2)	03	33,3482
Trat: D(3)	03	0,0000
Erro	24	80,2087
CV (%)	11,17	

\*\* Significativo ao nível de 1% pelo teste F

TABELA 1. Porcentagem média dos teores dos açúcares neutros nos tecidos de pêssego 'Biuti' injuriados ou não e curados por diferentes tempos, a 20°C e 75% UR

Açúcares neutros		Tempo de cura (horas)			
		0	24	48	72
Rhamnose	A	0.74a	0.70a	0.84a	0.78b
	B	0.87a	0.67a	0.69a	0.97a
Fucose	A	0.43a	0.39a	0.36a	0.44a
	B	0.46a	0.46a	0.33a	0.48a
Arabinose	A	10.95a	10.21a	8.18a	10.00a
	B	9.71a	10.44a	7.65a	11.52a
Xilose	A	2.67a	2.53a	2.11a	2.50a
	B	2.77a	2.28a	1.94a	2.72a
Manose	A	0.83b	0.76a	1,04a	0.94b
	B	1.37a	1.04a	0.82a	1.39a
Galactose	A	3.65a	2.50b	3.28a	3.22b
	B	4.08a	4.17a	2.38b	4.48a
Glicose	A	1.20a	0.73a	0.83a	0.79a
	B	1.04a	0.84a	0.59b	0.85a

A = Frutos sem injúria

B = Frutos injuriados

X = Para cada coluna dados seguidos da mesma letra não possuem diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



TABELA 2. Porcentagem média de frutos de pêssego 'Biuti' infectados com Monilinea fructicola após diferentes tempos de cura de ferimento a 20<sup>o</sup> C e 75-80% UR.

Tempo de Cura	Armazenamento Dias		
	1	2	3
Controle	93.33a	100a	100a
24	51.11b	93.33a	100a
48	33.33b	97.77a	100a
72	0 c	93.33a	100a

X = Para cada coluna dados seguidos da mesma letra não possuem diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.