

DEBORAH SANTESSO BONNAS

DESENVOLVIMENTO DE RESISTENCIA PÓS-COLHEITA
EM LARANJA 'VALENCIA' A *Penicillium digitatum* Sacc IN-
FLUENCIADA PELA TEMPERATURA E TEMPO DE CURA DE
FERIMENTO.

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
1991

DEBORAH SAITERSO BONVAS

DESENVOLVIMENTO DE RESISTENCIA PÓS-COLHEITA
EM LAVANDA VALENCIA A *Aspergillus* IN-
FLUENCIADA PELA TEMPERATURA E TEMPO DE CURA DE
FERIMENTO.

Trabalho apresentado à Escola Superior
de Agricultura de Lavras como parte dos
requisitos do Curso de Licenciatura em
Ciência dos Alimentos para obtenção
do grau de "Mestre em Ciências".

[REDACTED]

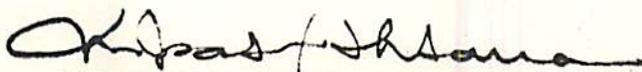


ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS

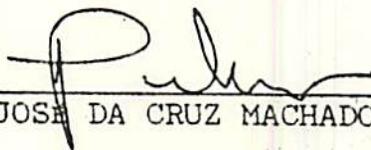
1991

DESENVOLVIMENTO DE RESISTENCIA POS - COLHEITA EM LARANJA
'VALENCIA' A *Penicillium digitatum* Sacc INFLUENCIADA PELA
TEMPERATURA E TEMPO DE CURA DE FERIMENTO.

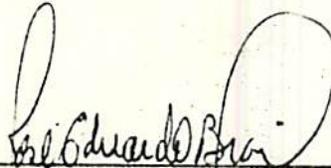
Aprovada: ____/____/____



Profª: MARIA ISABEL FERNANDES CHITARRA



Prof: JOSÉ DA CRUZ MACHADO



Prof: JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO

A Deus, pelas oportunidades a mim oferecidas

AGRADEÇO

Dedico este trabalho,
a meus pais Waldyr e Maria Ines,
a meus irmãos Fábio e Juliana,
a minha avó Ida.

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciências 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.

A Professora Maria Isabel Fernandes Chitarra pela orientação e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos Professores, Manoel Lousada Gavilanis, José da Cruz Machado, José Eduardo Brasil Pereira Pinto, Maurício de Souza e Admilson Bosco Chitarra, pelas sugestões e apoio.

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

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

Aos meus amigos Israel, Nádia, Mabel, Miriam, José Braulino, Elisa, Júlio, David, Aurora, Cláudia e colegas pelo apoio, convívio e amizade.

Ao Júnior pelo amor e incentivo.

A Adriana e Delly pela atenção dispensada no trabalho de digitação.

A todos que, direta ou indiretamente, tenham colaborado na realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DA AUTORA

DEBORAH SANTESSO BONNAS, filha de Waldyr Bonnas e Maria Inez Santesso Bonnas, nasceu em São Paulo, SP, a 3 de março de 1965.

Graduada em Agronomia, pela Escola Superior de Agricultura de Lavras - MG - ESAL, em dezembro de 1987, iniciou o curso de mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração Fisiologia Pós - Colheita de Frutos e Hortalças na Escola Superior de Agricultura de Lavras, em janeiro de 1988.

S U M A R I O

1. Introdução	01
2. Revisão de Literatura.....	04
2.1. Resistência de diferentes estruturas vegetais a orga- nismos patogênicos na fase pós - colheita.....	07
2.1.1. Hipersensibilidade.....	08
2.1.2. Produção de componentes antimicrobianos especí- ficos ou fitoalexinas.....	09
2.1.3. Formação de periderme de ferimento relaciona- da a resistência à doença.....	10
2.1.3.1. Atividade da Fenilalanina amônia lia- se.....	11
2.1.3.2. Alterações na parede celular.....	14
3. Material e Métodos.....	20
3.1. Procedência e pré-seleção dos frutos.....	20
3.2. Colheita e preparo das amostras.....	20
3.3. Instalação dos ensaios.....	21
3.4. Análises físicas, químicas e físico-químicas dos fru- tos selecionados.....	22
3.5. Técnica de ferimento mecânico dos frutos.....	25
3.6. Período de cura de ferimento.....	25
3.7. Inoculação de <u>Penicillium digitatum</u> Sacc em frutos...	27

3.7.1. Fonte do Inóculo e técnica de isolamento do patógeno.....	27
3.7.2. Preparo do Inóculo.....	27
3.7.3. Inoculação dos Frutos.....	28
3.7.4. Avaliação da Inoculação.....	28
3.8. Perda de peso dos Frutos.....	29
3.9. Análise enzimática.....	29
3.10. Análise histoquímica dos discos de tecidos de casca da laranja.....	31
3.10.1. Avaliação da intensidade da reação de coloração dos tecidos.....	32
3.11. Análise Estatística.....	33
4. Resultados e Discussão.....	34
4.1. Análises físicas, químicas e físico-químicas dos frutos.....	34
4.2. Influência da temperatura e tempo de cura no processo de resistência ao patógeno.....	34
4.3. Perda de peso.....	38
4.4. Atividade da FAL.....	40
4.5. Ensaio histoquímico.....	43
5. Conclusões.....	52
6. Resumo.....	53
7. Summary.....	55
8. Referências Bibliográficas.....	57
Apêndice.....	71

L I S T A D E T A B E L A S

TABELAS	Página
1 - Caracterização laranja 'Valencia' procedente de Lavras, MG, colhida no período de 26 de setembro a 05 de outubro de 1989.....	24
2 - Reações de coloração das paredes celulares de tecidos da casca da laranja 'Valencia' submetida ao processo de cura de fermento por diferentes espaços de tempo sob temperatura ambiente (20 - 25°C, UR 85 - 92%).....	46
3 - Reações de coloração das paredes celulares de tecidos da casca de laranja 'Valencia' submetida ao processo de cura de fermento por diferentes espaços de tempo, sob temperatura de 30°C, e UR 90%.....	47

L I S T A D E F I G U R A S

FIGURAS	Página
1 - Estilete para injuriar mecanicamente os frutos.....	26
2 - Perfurador utilizado para retirar os discos de tecidos dos frutos.....	26
3 - Esquema de laranja, representando os tecidos e a profundidade da injúria.....	26
4 - Resistência da laranja 'Valencia' ao ataque de <i>P. digitatum</i> , submetida à cura de fermento por diferentes tempos e condições de temperatura e umidade relativa, inoculada e armazenada sob temperatura ambiente.....	36
5 - Percentagem média de perda de peso da laranja 'Valencia' após cura de fermento a 30° e 90% U.R., armazenada sob temperatura ambiente (T.20 - 25°C.U.R.85 - 92%)....	39
6 - Atividade da Fenilalanina amônia-liase na casca da laranja 'Valencia' submetida ou não à cura de fermento sob diferentes temperaturas e umidades relativas.....	42

- 7 - Fotomicografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de laranja pela coloração Safranina Fast-Green: a) tecidos sem injúria - aumento de 54%. b) tecidos com injúria após 48 horas de cura - aumento de 200%, indicando: I- elementos lignificados, II- mistura de fenólicos, III- paredes celulares não lignificadas..... 49
- 8 - Fotomicografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo da laranja pela coloração Azul de O-toluidina: a) tecidos sem injúria - aumento de 54%. b) tecidos com injúria após 36 horas de cura - aumento de 200%: indicando : I-substâncias fenólicas, II- paredes celulares não lignificadas, III- cutícula e elementos lignificados..... 50

L I S T A D E A B R E V I A T U R A S

U.R. - Umidade relativa

PVP - Polivinilpirrolidona

SST - Sólidos solúveis totais

FAL - Fenilalanina amônia liase

cv - Cultivar

D.B.O. - Demanda Biológica de Oxigênio

1. INTRODUÇÃO

A laranja 'Valencia', Citrus sinensis L Osbeck, pertence ao grupo de maior importância entre os frutos cítricos, as laranjas doces, GOMES (38). É uma das variedades mais cultivadas e de grande interesse comercial na maioria dos países produtores, correspondendo a 50% do total de laranjas produzidas nos Estados Unidos, FAJAC (30). No Brasil, devido às suas características de boa produtividade e tamanho dos frutos, encontra-se em constante expansão. A maior parte da produção concentra-se no Estado de São Paulo que, até 1988, participava com 82% do total de caixas de laranjas colhidas no país, seguido dos Estados de Sergipe e Rio de Janeiro, BEHR & FAIRCHILD (6) e FUNDAÇÃO GETULIO VARGAS (34). Apesar das condições favoráveis de cultivo e da grande produtividade obtida, a preparação dos frutos para o mercado de consumo ao natural é rudimentar na sua maior parte. A quase totalidade dos frutos é destinada à indústria de sucos concentrados, havendo um pequeno número de centrais de embalagens para cítricos no país.

Nessas condições, a falta de cuidados específicos, em relação à colheita, transporte e armazenamento, pode acarretar uma série de danos aos frutos, prejudicando sua qualidade. Injúrias superficiais, muitas vezes imperceptíveis logo após a colheita, desenvolvem cicatrizes como resultado da perda de umidade no local do ferimento, reduzindo a aparência dos frutos podendo torná-los inaceitáveis no mercado, GOLOMB et alii (37). A ocorrência de injúria também é responsável pela exposição dos frutos a diversas podridões pós-colheita, entre as quais se sobressaem o mofo verde e o mofo azul, causados pelo Penicillium digitatum e Penicillium italicum, respectivamente. No Brasil, ambos trazem imensos prejuízos, que se tornam maiores porque predispõem o mercado externo contra o produto nacional, GALLI (36).

O estudo dos mecanismos envolvidos no processo de cura de ferimento e resistência é essencial para o controle de várias doenças pós-colheita. E através de seu conhecimento, que técnicas específicas podem ser desenvolvidas, visando a diminuição das perdas. melhoria da qualidade, queda nos custos de produção e aumento da disponibilidade de frutos comercializáveis.

Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo geral, tendo-se em mente o controle do mofo verde dos citros, determinar se a temperatura e o tempo de cura de ferimento influenciam no processo de resistência dos frutos ao Penicillium digitatum, estimulando alterações bioquímicas e histoquímicas de laranja 'Valencia' injuriada mecanicamente.

Como objetivos específicos deste trabalho, foram propostos: 1 - verificar o efeito do tempo de cura de ferimento e

da temperatura no desenvolvimento de resistência dos tecidos ao ataque do Penicillium digitatum durante o armazenamento dos frutos.

- 2 - Quantificar a perda de peso dos frutos, relacionando-a com a aparência durante o armazenamento.
- 3 - Determinar a atividade da Fenilalanina amônia liase em resposta à cura de ferimento.
- 4 - Avaliar, por meios histoquímicos, as respostas morfo-anatômicas e metabólicas dos tecidos no processo de cura de ferimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Hortalicas e frutos frescos são, geralmente, produzidos em áreas distantes dos grandes centros populacionais e, em alguns casos, a maturidade e a época de maior demanda do produto são divergentes. Tais circunstâncias podem implicar um período de vários dias, semanas ou até meses de armazenamento e transporte antes que o produto atinja o consumidor, ECKERT (27). Durante esse período, cuidados na manipulação, controle de temperatura e umidade, entre outros procedimentos, são basicamente necessários para que não ocorram perdas substanciais devidas ao ataque por fungos e bactérias.

Os frutos maduros são susceptíveis ao ataque por uma variedade de microrganismos aos quais foram resistentes durante seu período de desenvolvimento na planta. Entretanto, para cada cultivar de frutos e hortalicas, 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(33). São patógenos típicos desse grupo Monilinia fructicola que causa podridão marrom em pêssegos, cerejas, maçãs e peras, não produzindo a doença em frutos tropicais. Ainda nesse grupo podem ser citados Penicillium digitatum e P. italicum que causam doenças pós-colheita em frutos cítricos, enquanto o Penicillium expansum, é um sério patógeno de maçãs e peras, e não ataca os frutos cítricos, ECKERT (27).

Algumas das mais devastadoras doenças pós colheita se desenvolvem a partir de infecções iniciadas por injúrias mecânicas e fisiológicas na superfície do fruto, ECKERT (28).

Em frutos cítricos, níveis de podridão de 40% a 50% ou mais, podem ocorrer duas a três semanas após a colheita em circunstâncias extremas, sem o emprego das medidas necessárias de controle. Todos os custos de produção, colheita, embalagem e transporte são perdidos quando as podridões ocorrem a nível de mercado consumidor, BROWN (14).

O mofo verde, causado por Penicillium digitatum Sacc é uma das principais doenças pós-colheita dos frutos cítricos, BROWN (11). O fungo se desenvolve apenas a partir de injúrias na casca, sendo que, pequenos ferimentos, envolvendo pequenas glândulas de óleo, são suficientes para levar à infecção, BROWN (14).

A doença causa caracteristicamente uma podridão mole, aquosa, que se inicia em qualquer parte da superfície do fruto afetado e se desenvolve rapidamente, envolvendo o fruto por completo. O tecido, recoberto por crescimento e frutificação,

apresenta revestimento de cor verde oliva circundado por uma faixa de crescimento branca, relativamente larga e, separada do tecido sadio, por uma estreita faixa de tecido encharcado. O fungo apresenta micélio inter e intracelular, ramificação hialina com enzimas capazes de dissolver a lamela média no tecido do hospedeiro. Produz enorme quantidade de conídios unicelulares esféricos, catenulados, na extremidade de ramificações de conidióforos típicos do gênero. Ascosporos são produzidos muito raramente na natureza, à partir de escleródios, GALLI (36) e KLOTZ (53).

Um maior cuidado com a manipulação na operação durante e após a colheita, com o objetivo de reduzir injúrias mecânicas, também reduz as perdas devido a infecção. Tais medidas, associadas a condições ideais de temperatura e umidade relativa, podem prolongar a vida pós colheita dos frutos cerca de duas a três semanas, dependendo da cultivar, CITROGRAPH (22).

Em alguns países, a incidência do mofo-verde tem decrescido devido a condições utilizadas no processo de desverdecimento. Essa prática consiste em expor os frutos cítricos ao etileno, sob temperaturas em torno de 30°C e umidade relativa na faixa de 90-96% por 60 a 72 horas, objetivando degradar a clorofila da casca, para o aparecimento dos pigmentos flavonóides e carotenóides.

As altas temperaturas e umidades relativas utilizadas nas câmaras de desverdecimento, favorecem a cura a qualquer injúria superficial do flavedo (exocarpo), BROWN & BARMORE (17). O fungo cresce lentamente sob alta temperatura e torna-se incapaz de penetrar em injúrias, após estas serem curadas, formando uma

barreira à infecção, BROWN (14).

Através dessa prática, é possível prover ao mercado frutos sem o uso de fungicidas pós-colheita, reduzindo os custos de produção e facilitando a comercialização do produto nos mercados interno e externo, CITROGRAPH (22).

2.1. Resistência de diferentes estruturas vegetais a organismos patogênicos na fase pós-colheita.

Para que se possa aprimorar as técnicas no controle das podridões pós-colheita é necessário que se compreenda não apenas o comportamento do patógeno, mas sua interação com a planta hospedeira e o tipo de mecanismo de resistência do vegetal envolvido, BOSTOCK & STERMER (9).

A resistência de plantas e patógenos é bem mais comum que a susceptibilidade, aparentando todas as plantas possuírem um mecanismo de resistência que as protege do ataque por vários microrganismos, ECKERT (27). Essa é, presumivelmente, a razão pela qual os patógenos possuem relativamente uma área restrita de ação.

Investigações sobre mecanismos de resistência à doenças demonstraram que os mesmos podem ser divididos em duas categorias. A primeira inclui a produção, pelo vegetal, de substâncias antimicrobianas e substâncias inibidoras da síntese de enzimas degradantes da parede celular produzida pelos patógenos. Essas substâncias estão presentes nas plantas, antes da inoculação, nos dois estados: livres ou combinadas. 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 (33).

2.1.1. Hipersensibilidade

Um dos mais amplamente observados e, talvez, um dos mais 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 mecanismos não patogênicos ou, a uma raça patogênica à qual seja resistente, DARVILL & ALBERSHEIN (24). A morte do fungo seria, então, causada pela restrição do suprimento de nutrientes e também pela produção de metabólitos fungitóxicos, FRIEND (32).

DAYKIN & MILHOLAND (25), comparando a reação de duas cultivares de uvas a Colletotrichum gloeosporioides, observaram que, na cultivar Pride, resistente, ocorria uma forte reação necrótica no local de penetração do fungo, não havendo uma subsequente divisão celular nas camadas adjacentes ao sítio de infecção. No entanto, essa divisão celular, era observada na cultivar Carlos, susceptível.

HEATH (43), após estudos sobre a resistência de gramíneas à ferrugem, concluiu que esse é um fenômeno complexo, e que a hipersensibilidade, nesse caso específico, pode funcionar com um fator primário na restrição do crescimento fúngico, ou ser apenas um produto resultante de várias interações preliminares

entre a planta e seu patógeno potencial.

MOERCHBACHER et alii (65) observaram que as células mortas estimulavam a lignificação em hastes de trigo, sendo possivelmente as responsáveis por sua resistência à ferrugem.

2.1.2. Produção de componentes antimicrobianos específicos ou fitoalexinas.

Fitoalexinas são componentes antimicrobianos de baixo peso molecular, que são sintetizados e acumulados em vegetais a partir de sua exposição a microrganismos e outros agentes. O fato de as fitoalexinas não estarem presentes em plantas saudáveis e se acumularem no local de infecção microbiana pode indicar sua relação com a função de defesa do organismo vegetal, DARVILL & ALBERSHEIN (24). Por exemplo KUC (57), observou que cenouras produziram isocoumarina 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).

A quantidade de fitoalexinas acumuladas em diferentes plantas é altamente variável e depende do estado fisiológico do vegetal, das combinações ambientais, do patógeno e da capacidade genética da planta em responder ao estímulo, DARVILL & ALBERSHEIN (24).

2.1.3. Formação de periderme em ferimento, relacionada a resistência a doenças.

A periderme em áreas de tecido com ferimento tem sido tradicionalmente considerada um mecanismo de defesa passivo. As barreiras têm uma função restritiva ao patógeno. Porém, os eventos que ocorrem como parte desse processo possuem um significativo papel na defesa do vegetal, BOSTOCK & STERMER (9).

Estudos, sobre a formação de lignina e suberina, sugerem que há vários caminhos pelos quais esses polímeros podem interferir no ingresso de patógenos em tecidos vegetais, RIDE (72) e VANCE et alii (83). Se, por um lado, a barreira funciona como impedimento para perda de nutrientes das plantas e evita a entrada de componentes tóxicos do microrganismo, funciona também como local para concentração de fitoalexinas e outros componentes antibióticos, HAMMERSCHIMIDT & KUC (42). Precusores fenólicos da lignina, particularmente os aldeídos cinâmicos e radicais livres, gerados durante a polimerização, possuem também atividade antibiótica. Nesse contexto, eventos induzidos pela injúria podem ser considerados como uma resposta ativa da planta, devendo ser analisados em todas as etapas.

2.1.3.1. Atividade da Fenilalanina Amônia-liase

O metabolismo de fenilpropanóides é importante sob os vários aspectos da fisiologia pós colheita de frutos e hortaliças. Esses componentes contribuem na cor, textura e "flavor" de vários vegetais e atuam na resposta a estresses e danos mecânicos. São sintetizados a partir do aminoácido aromático fenilalanina, RHODES (72).

Estímulos causados por injúrias mecânicas também afetam o metabolismo fenilpropanóide do tecido vegetal. A ativação dessa via metabólica em vegetais doentes tem sido associadas aos mecanismos de resistência do hospedeiro ao patógeno. Normalmente, esse metabolismo conduz à formação de ácido cinâmico, que é precursor de inúmeros compostos encontrados naturalmente no tecido vegetal como lignina e flavonóides, LEGRAND (59).

A reação de desaminação da L-fenilalanina para produção de ácido transcinâmico e amônia é catalizada pela fenilalanina amônia-liase (FAL), ROUBELAKIS-ANGELAKIS & KLIEWER (78) e RHODES (72). Essa enzima é a mais estudada relativa ao metabolismo secundário das plantas. Um dos motivos dessa atenção pelos pesquisadores é que, em um dado tecido, os níveis da enzima podem variar significativamente em intervalos de tempo relativamente curtos, CAMM & TOWERS (20), HABEREDER et alii (40) e BORCHERT (8).

O controle da lignificação ou síntese de flavonóides pode ser afetado pela regulação dos níveis de produção da FAL, ou de fenilalanina ou de ambos. Sendo o ácido cinâmico o primeiro componente responsável estritamente pela biossíntese de moléculas como flavonóides, é de se esperar que a FAL possua propriedades reguladoras. Uma confirmação da atuação da FAL, no controle do metabolismo de compostos fenólicos em vegetais pode ser obtida com o emprego de tratamentos que estimulam a atividade da enzima. Se a FAL é realmente um fator limitante na biossíntese dos compostos fenólicos, aumentos na concentração enzimática devem também ser acompanhados de elevações nos níveis de compostos fenólicos, CANN & TOWERS (20). Aumentos concomitantes nos níveis da FAL e compostos fenólicos têm sido observados em muitas plantas e tecidos vegetais, (12, 40, 45 e 48).

O processo de desverdecimento em cítricos, envolvendo alta umidade relativa e temperatura em torno de 30°C, provoca um rápido aumento dos compostos fenólicos, ISMAIL & BROWN (48). O estímulo da atividade da FAL em frutos cítricos pode ser induzido por ferimentos, ISMAIL & BROWN (49), aplicação de etileno, RIOV et alii (76) e radiação RIOV et alii (75). ISMAIL & BROWN (49) observaram que, em tecidos intactos de laranja 'Valencia' não ocorriam mudanças na atividade da FAL, enquanto, nos tecidos injuriados, a atividade da enzima manteve-se em elevação durante as 72 horas seguidas à injúria, nas quais a enzima foi doseada.

RIOV et alii (76), estudando a influência do etileno exógeno na atividade da FAL em casca de pomelos, observaram que o dióxido de carbono e a cicloheximida inibiam a produção de

etileno e a atividade da FAL nos discos de tecidos. A ação inibitória de ambos foi atribuída ao efeito regulador do etileno endógeno na síntese de novo de proteínas.

Em pomelos injuriados, a inoculação de patógenos, nos frutos tratados com etileno provoca uma inibição na atividade da FAL, LISKER et alii (64). Os mesmos resultados foram observados em laranjas inoculadas com *P. digitatum*, ISMAIL & BROWN (49). Tais resultados podem ser atribuídos ao fato de que a injúria mecânica destrói apenas uma pequena parte das células, permitindo que as células vivas adjacentes tenham um aumento na atividade da FAL. A injúria promovida por fungos, por outro lado, necrosa um maior número de células no tecido. Outro ponto a ser observado é que o etileno produzido durante a interação parasita-hospedeiro só atinge níveis que possam induzir a atividade da FAL, apenas quando a maior parte do fruto está infectada pelo fungo, RIOV et alii (76). Portanto, nesse caso, o etileno provoca muito pouco, ou nenhum efeito na indução da enzima.

Um aumento na atividade da FAL foi observado após injúria em folhas de trigo, RIDE (72). Também foram observados aumentos nos resíduos de ácido p-coumárico e lignificação.

Em cítricos, o aumento da atividade da FAL é provavelmente responsável pela lignificação e aumento nos níveis de compostos fenólicos livres no flavedo injuriado, BROWN & BARMORE (16).

2.1.3.2. Alterações na Parede Celular

Existem várias evidências histológicas e ultraestruturais na literatura, citando modificações na parede celular que ocorrem após injúria e/ou infecção, e que provavelmente devem ser responsáveis pela resistência. Diferentes tipos de alterações das paredes celulares têm sido observadas em plantas injuriadas. Dentre as mais estudadas, encontram-se a deposição de calose, o acúmulo de cálcio ou silicone, a suberização, a impregnação das paredes com fenóis e ácidos fenólicos e a lignificação..

A calose, um $\beta(1-3)$ glucana, é aparentemente o principal componente da papila. A papila, também chamada calosidade ou calos é um tipo de deposição de substâncias na parede celular que se dá em resposta à infecção, AIST (1). WHEELER (88), sugeriu que essas estruturas restringem o movimento das moléculas e, portanto, previnem a perda excessiva de íons da célula danificada, ou o movimento de materiais tóxicos dentro delas. Em mamões foram observadas deposição de calose e proliferação celular nas camadas abaixo do apressório latente de Collectotrichum gloeosporioides, STANGHELLINI & ARAGAKI (80). Em frutos cítricos a deposição de calose não foi observada, BROWN (13).

O acúmulo de cálcio e outros íons pode ocorrer em algumas infecções. BATEMAN (4) observou o acúmulo de cálcio em infecção causada por Rhizoctonia em hipocótilo de feijão. A maior concentração de íons pode tornar o pectato mais resistente à degradação enzimática. Da mesma forma, o silicone pode aumentar

a resistência física da parede celular e da papila, RIDE (72).

A cutina é um polímero estrutural componente da cutícula vegetal que é a barreira mais externa da planta. Sua função é crucial na interação entre a planta e seu ambiente, incluindo a interação com os patógenos presentes no meio, KOLATTUKUDY (54). Para invasão do tecido os fungos utilizam a cutinase, enzima que tem sido isolada em vários fungos patogênicos, LIN & KOLATTUKUDY (62).

A suberina é um material polimérico insolúvel fixado nas paredes celulares de peridermes, endodermes, incluindo a formação de periderme de ferimento em partes aéreas de vegetais, KOLATTUKUDY (54 e 55). Sua produção pode, em alguns casos, estar relacionada com a resistência. Talboys, citado por RIDE (74) sugeriu que a invasão do sistema vascular de lúpulo por Verticillium albo-atrum é grandemente reduzida pela suberização das paredes celulares da endoderme da raiz. CHAREST et alii (21), estudando os mecanismos de resistência de tomate a Fusarium oxysporum, observaram uma leve tolerância na cultivar susceptível Vendor. Essa resistência foi atribuída como possível resultado da presença de substâncias suberizadas nas células corticais externas da raiz.

Investigações anteriores sobre patogênese e simbiose sugerem que há uma associação entre a presença de componentes tóxicos e a extensão do crescimento fúngico no tecido vegetal. Brown, 1922 citado por VAN DER PLANK (82), estudando as substâncias presentes na cutícula de plantas, observou que algumas delas inibiam a germinação dos esporos de fungos.

Os componentes fenólicos, estão largamente distribuídos no reino vegetal. Em muitas plantas, ocorre uma aceleração na biossíntese de fenólicos após a infecção por patógenos sendo, em vários casos, esse aumento mais acentuado em hospedeiros resistentes, LEGRAND (59).

LE TORNEAU et alii (80 e 81), estudaram a estrutura química, associada a toxidez dos compostos fenólicos. Treze fenóis e ácidos fenólicos e quatro quinonas foram investigadas, usando-se observações sobre o seu efeito no fungo Verticillium albo-atrum. Das três formas isoméricas dihidroxibenzeno, o catecol foi a mais inibitória. A troca de um dos grupos hidroxila por um grupo carboxila, no anel benzeno, reduziu a toxidez do catecol

Os taninos foram um dos primeiros componentes fenólicos a atrair a atenção como substâncias envolvidas na proteção de plantas após a infecção, LEGRAND (59). As cortiças de muitas plantas contém taninos e outros complexos de polifenóis como o pirocatecol, salicilina, saligenina e derivados do ácido salicílico. que possuem atividade fungistática.

A inoculação do fungo Phytophthora parasitica em tomateiros provocou o acúmulo de substâncias fenólicas nas variedades mais resistentes, VERNENGHI & RAVISE (83). Observou-se que, nas folhas, os elicitores fúngicos também estimularam a síntese de fenólicos.

Os elicitores são fragmentos de esporos ou micélios de fungos, esporos mortos, entre outros fatores bióticos ou abióticos, cuja presença estimula a síntese de compostos fenólicos e a primeira enzima da rota do shiquimato num aumento de 2 a 3 vezes

na atividade e, com um efeito marcante de 9 vezes, na atividade da FAL, McCUE et alii (64), HAHLBROCK et alii (41).

AMPOMAH & FRIEND (2) comparando a resposta de resistência de duas cultivares de batata: uma resistente e outra susceptível a Phytophthora infestans, observaram que o acúmulo de fenólicos era mais significativo que o acúmulo de fitoalexinas na cultivar resistente.

Em laranja 'Valencia' injuriada e curada a 30°C e 96-98% de umidade relativa, a concentração de fenólicos livres dobrou no período de 48 horas, ISMAIL & BROWN (48). Já nos frutos mantidos sob a umidade relativa ambiente (55-75% U.R.), ocorreu apenas um ligeiro aumento nos fenólicos livres.

BROWN & BARMORE (17) observaram que a resistência do exocarpo injuriado de laranjas a P. digitatum era manifestada pela restrição da hifa à superfície curada e/ou células adjacentes. As células do exocarpo acumularam compostos fenólicos e lignina a partir de 30 horas após a injúria.

A exposição de laranja 'Valencia' e 'Navel' ao etileno, durante 2 a 6 dias, diminuiu a incidência do mofo azul, causado por P. italicum. Essa resistência foi atribuída à síntese de compostos fenólicos, que restringiram a área de crescimento fúngico, EL-KAZZAZ et alii (29). O uso do etileno estimulou a síntese de compostos fenólicos e lignina em tangerinas 'Robinson', BROWN & BARMORE (15). O exocarpo dos frutos tratados por 3 dias foi resistente à penetração por Collectotrichum gloeosporioides.

A lignina é um dos mais importantes biopolímeros da

natureza e é resistente à degradação por vários microrganismos, VANCE et alii (83).

A unidade básica das ligninas é o fenilpropanóide. São formadas pela polimerização oxidativa dos alcóois p-coumaril, coniferil e sinapil. Dos resultados de experimentos nos quais a L-fenilalanina radioativa e o ácido cinâmico foram testados como precursores da lignina Brown et alii, citados por KOUKOL & CONN (56), postularam que a L-fenilalanina se convertia em ácido cinâmico através de uma sequência de reações, envolvendo transaminação, redução e desidratação.

A lignificação pode ser induzida por vários elicitores, tais como fragmentos de micélios de fungos, pectinas, ácidos poligalacturônicos ou quitosanas. É formada comumente como resposta à penetração microbiana e a injúrias mecânicas.

A presença de lignina e de substâncias lignificantes, bem como de altos graus de fenólicos e de taninos, evidenciou a ocorrência de cura de ferimento em maçãs, LAKSHMINARAYANA et alii (58), tangerinas BROWN (12), laranjas BROWN et alii (18) e BROWN (16), pepinos, WALTER Jr. et alii (86), entre outros órgãos vegetais, RITTINGER et alii (77). O acúmulo dessas substâncias ocorreu paralelamente ao aumento da resistência à infecção por patógenos. Observações histológicas em tomates injuriados mostraram claramente uma lignificação dos tecidos cicatrizados do ferimento sobre o pericarpo dos frutos, FLEURIET & DELOIRE (32). Em limões, as feridas inoculadas com Collectotrichum gloeosporioides apresentaram maior produção de lignina, com maior acúmulo de polímero no local de maior concentração de esporos do inóculo, BAUDOIN & ECKERT (5).

Segundo vários autores (7, 11, 12, 15 e 16), as respostas às injúrias em frutos cítricos, que estão relacionadas com a resistência à doenças, incluem a deposição de lignina e a produção de felema e felogênio, assim como um aumento dos fenólicos livres.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedência e Pré seleção dos frutos

Os frutos da cultivar Valencia, Citrus sinensis L Osbeck, utilizadas no presente trabalho foram obtidos no pomar da Escola Superior de Agricultura de Lavras, ESAL Sul de Minas Gerais. O município situa-se nas seguintes coordenadas: 21° 14' 06" S e 45° 00' 10" W Gr, localizado a 918m de altitude.

3.2. Colheita e preparo das amostras.

Os frutos foram colhidos no ponto de maturidade comercial e pré selecionados, considerando-se ausência de injúrias visuais e infecções, e uniformidade de tamanho e cor.

Após o acondicionamento em caixas plásticas com capacidade para 150 frutos, estes foram transportados para o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Pós Colheita de Frutos e Horta-

liças do Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA ESAL).

No laboratório, as laranjas foram selecionadas por uniformidade de cor e tamanho, eliminando-se aquelas com injúrias mecânicas. Após a seleção, os frutos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos e secos em temperatura ambiente.

3.3. Instalação dos ensaios

Foram realizados três ensaios, a saber:

No ensaio 1, conduzido para o estudo da resistência dos frutos injuriados e curados, ao fungo Penicillium digitatum, foram consideradas duas temperaturas de cura: a) temperatura ambiente (20-25°C UR 85-92%) e b) 30°C e UR 90%, e 4 períodos de tempo 0, 24, 48 e 72 horas, nos quais os frutos previamente feridos (injuriados) foram curados. Posteriormente, os frutos foram inoculados e armazenados sob temperaturas ambiente. Os frutos foram avaliados de 4 em 4 dias por um período de 22 dias de armazenamento.

O delineamento constituiu-se num fatorial 2x4 inteiramente casualizado com 4 repetições. A unidade experimental constou de 9 frutos.

No ensaio 2, tendo como intuito avaliar a atividade enzimática, foram considerados frutos injuriados e frutos não injuriados, submetidos a duas temperaturas de cura de (20 -25°C e 30°C) em nove períodos de tempo, (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas) num fatorial de 2x2x9 em delineamento inteiramente

casualizado, com 3 repetições. A unidade experimental constou de 5 frutos.

O ensaio 3, teve como objetivo avaliar a perda de peso dos frutos através de monitoramento, utilizando-se frutos submetidos aos mesmos procedimentos do ensaio 1, constituindo-se exceto pela inoculação, constituindo um fatorial de 2x2x4 num delineamento experimental casualizado com três repetições. A unidade experimental constou de 6 frutos.

Para os três ensaios foram utilizados 1116 frutos.

3.4. Análises físicas, químicas e físico-químicas dos frutos selecionados

Para caracterização do estágio de maturação, foram utilizados frutos íntegros e sem injúria, nos quais foram realizadas as seguintes determinações:

- Peso(g): obtido por gravimetria.
- Diâmetro longitudinal e transversal: com auxílio do paquímetro.
- Forma: determinada através da relação entre os diâmetros transversal e longitudinal.
- Espessura da casca (mm): obtida por medida de diversos pontos no fruto cortado transversalmente, computando-se a média das medições.
- Número de sementes: por contagem direta no fruto cortado transversalmente.
- Rendimento em suco (ml/100g de fruto): medida de

- volume de suco obtido com auxílio de extrator mecânico com cabeça rotativa, calculando-se o rendimento em função do peso dos frutos.
- pH determinado eletrometricamente, no suco antes da filtração pelo método aconselhado segundo as normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (47).
 - Acidez Total Titulável (ATT): determinada por titulometria em solução de NaOH, expressos os resultados em percentagem de ácido cítrico por 100 ml de suco, de acordo com os métodos da AOAC (3).
 - Sólidos Solúveis Totais (SST): foram determinados por refratometria a 20°C, conforme indicação da AOAC (3).
 - Relação SST/ATT: obtida relacionando-se o teor de SST (g/100ml) com a ATT (expressa em percentagem de ácido cítrico).
 - Glicídes: determinados quantitativamente os glicídes redutores totais, expressos em percentagem de glicose e os glicídes não redutores, expressos em percentagem de sacarose (após inversão ácida da sacarose), pelo método de SOMOGYI modificado por NELSON (66).
 - Vitamina C total: determinada espectrofotometricamente, usando a 2,4 dinitrofenilhidrazina. Após a oxidação do ácido ascórbico à dehidroascórbico a determinação foi feita a 520nm, conforme técnica descrita por BRUNE et alii (19). Os resultados foram expressos em mg/100ml.

TABELA 1 - Caracterização da laranja 'Valencia' procedente de Lavras, MG, colhida* no período de 26 de setembro a 05 de outubro de 1989.

DETERMINAÇÕES *	

Peso do fruto (g)	148,6
Diâmetro longitudinal (cm)	6,61
Diâmetro transversal (cm)	6,64
Espessura da casca (cm)	0,453
Número de sementes/fruto	5,0
Rendimento em suco (ml/100g)	46,9
pH do suco	3,37
Acidez total titulável (% ac. cítrico)	1,48
Sólidos solúveis totais (g/100ml de suco)	13,2
SST/ATT	8,9
Vitamina C total (mg/100ml de suco)	65,5
Glicídes redutores (% de glicose)	4,90
Glicídes não redutores (% de sacarose)	4,94
Carotenóides totais (mg/100ml de suco)	0,737

* Média de 30 frutos.

- Carotenóides totais: determinados espectrofotometricamente a 450nm, conforme técnica descrita por HIGBY (44) e os resultados expressos em mg/100ml de suco.

3.5. Técnica de Ferimento Mecânico dos frutos.

Os frutos foram separados ao acaso em grupos de 9 unidades e acondicionados em caixas de papelão perfurado (24x24x8,5cm). Metade dos grupos foi ferida mecanicamente (tratamento com injúria) e a outra sem ferimento, foi utilizada como controle.

A injúria mecânica foi realizada assepticamente em capela de fluxo contínuo, com auxílio de um estilete com 1mm de diâmetro e 1,5 mm de comprimento, (Figura 1). Para os ensaios de resistência e perda de peso, foi feita apenas uma injúria, e para os ensaios enzimáticos, os frutos foram injuriados em quatro locais equidistantes em sua superfície.

3.6. Período de cura de ferimento.

Para os três ensaios, parte dos frutos com e sem injúrias, foi acondicionada em estufa para D.B.O. com temperatura (30°C) e umidade relativa (90%) controladas. A outra metade foi armazenada em ambiente, à com temperatura entre 20-25°C e umidade relativa entre 85-92%.

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

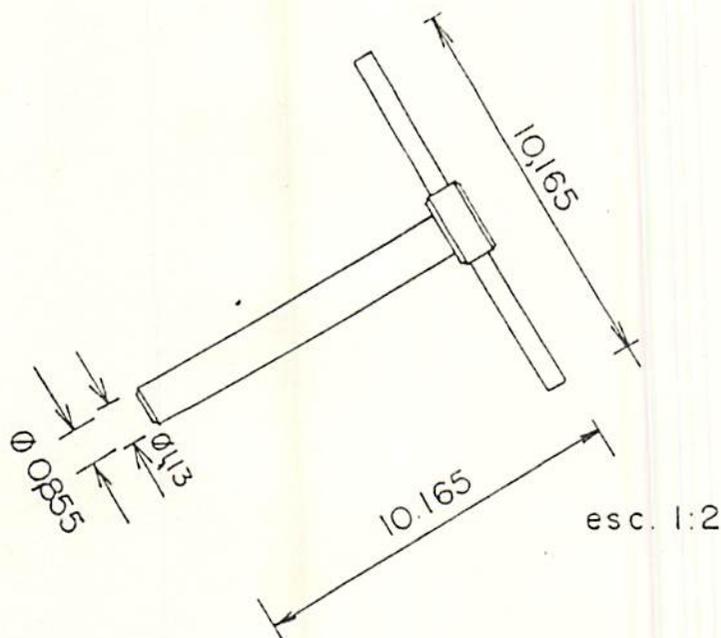
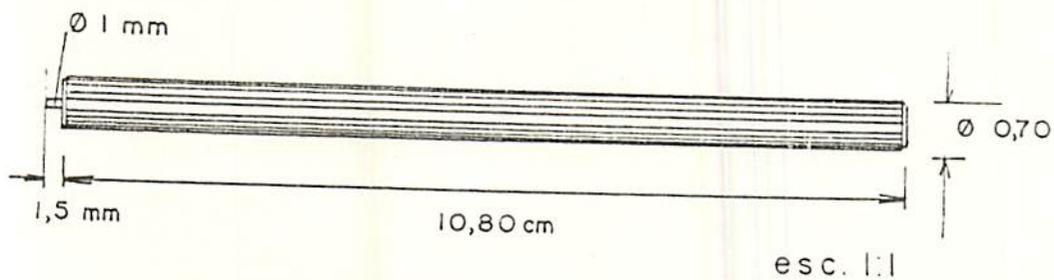


Fig. 2 — Perfurador utilizado para retirar os discos de tecidos dos frutos.

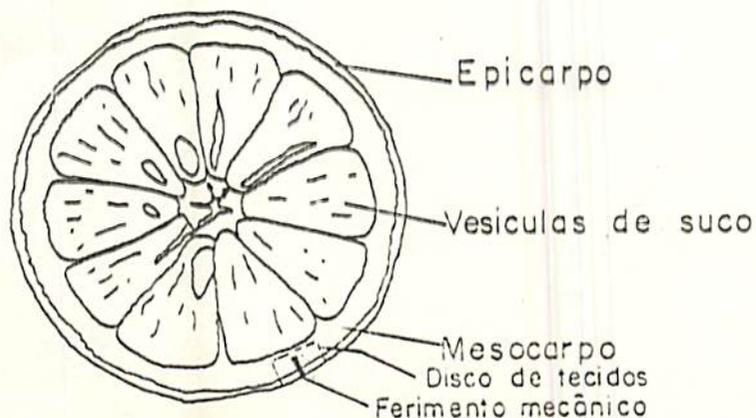


Fig. 3 — Esquema de laranja representando os tecidos e a profundidade da injúria.

3.7. Inoculação de Penicillium digitatum Sacc. em frutos.

3.7.1. Fonte do Inóculo e técnica de isolamento do patógeno

O fungo foi obtido a partir de frutos cítricos infectados procedentes do pomar da ESAL.

Para obter-se culturas puras do patógeno, fez-se o isolamento a partir de esporos presentes nas lesões dos frutos infectados. Com auxílio de um bisturi, fez-se assepticamente a remoção superficial dos esporos na área infectada do fruto, transferindo-os para meio contendo B D A (Batata 200g, dextrose 20g, agar 18g, água 100ml) em placas de Petri. As placas foram incubadas em câmara a 20°C por 7 dias. As culturas puras, assim obtidas, foram conservadas em placas de Petri, contendo B D A, a 10°C.

3.7.2. Preparo do Inóculo

A suspensão de esporos foi preparada colocando-se 10 ml de água destilada e esterelizada em cada placa, contendo a colônia fúngica. Com auxílio de bisturi, fez-se a raspagem superficial sobre a colônia, obtendo-se uma suspensão, à qual

foi adicionado Tween 80 (1 gota/100ml de suspensão) para dispersão mais homogênea dos esporos. A concentração da suspensão, 2×10^6 esporos/ml foi obtida através de diluições com base na hemacitômetro, sendo a mesma utilizada logo após o preparo.

3.7.3. Inoculação dos frutos

Após cada período de fermento (nas condições previamente descritas), os frutos foram inoculados assepticamente, em capela de fluxo laminar, empregando-se o mesmo estilete utilizado para fazer o ferimento, imerso na suspensão de esporos e introduzido no local da injúria. Nos frutos componentes dos tratamentos controle (não inoculados), o estilete foi assepticamente imerso em água esterelizada e introduzido no ferimento para evitar-se o ressecamento da injúria.

Após a inoculação, os frutos de todos os tratamentos foram mantidos em ambiente com temperatura entre 20 e 25°C e U.R. entre 85 e 92% até o final do experimento.

3.7.4. Avaliação da inoculação

Os frutos que manifestavam a doença eram transferidos para uma câmara úmida, com alta temperatura, para acelerar a

esporulação do fungo. Confirmada a infecção pelo Penicillium digitatum, os frutos eram computados e descartados para se evitar a contaminação dos restantes.

3.8. Perda de peso dos frutos

Após o período de cura, os frutos sem inoculação, foram levados para o local de armazenamento com temperatura de 20 a 25 °C e U.R. entre 85 e 92%. Os frutos foram pesados diariamente.

3.9. Análise Enzimática

Foram cortados discos de tecidos com 1cm de diâmetro e profundidade de aproximadamente 3 a 4 mm ao redor dos ferimentos nos frutos injuriados, não inoculados. Discos de mesma dimensão e em locais similares àqueles das injúrias foram retirados dos frutos não feridos.

Os discos foram retirados após 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas de cura do ferimento dos frutos, utilizando-se um perfurador de aço inoxidável (Figura 2). Um esquema da laranja, representando os tecidos e a profundidade da injúria encontra-se na Figura 3.

Uma vez retirados, os discos foram separados em dois grupos, um dos quais imediatamente colocado sob nitrogênio líqui-

de e armazenado em freezer (-18°C) até a realização das análises enzimáticas.

Para as análises histoquímicas, o outro grupo de discos foi armazenado 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.

A atividade da FAL foi determinada a partir do doseamento da quantidade de ácido cinâmico formado, segundo método descrito por ZUCKER (89), HYODO, KURODA & YANG (45) e HYODO & YANG (46).

A extração da FAL foi realizada, triturando-se 3g de discos (tecidos da casca de laranjas congelados) com 12 ml de tampão borato 50mM contendo 60 microlitros de 2 - Mercaptoetanol e 0,3g de PVP, pH 8,5, a 4°C em homogenizador de tecidos.

O extrato foi centrifugado a 25.000g por 15 minutos a 4°C . Do sobrenadante (extrato enzimático) foram transferidos 2 ml para o tubo de ensaio aos quais adicionou-se 2 ml do tampão borato 50mM. O tubo foi colocado em banho-maria 40°C por 5 minutos, acrescentando-se ao mesmo 0,55 ml L-fenilalanina 100mM e encubando-se em banho-maria a 40°C por 1 hora. A absorvância dessa mistura reagente foi medida a 290nm. Uma unidade de atividade enzimática (UA/h) foi definida como a quantidade da FAL que produz um aumento de 0,01 unidade/hora na absorção a 290nm. Esta mudança na absorção é equivalente à formação de 1 μM de ácido cinâmico/hora.

3.10. Análise histoquímica dos discos de tecidos de casca de laranja

Os discos de casca de laranja, cortados ao redor de áreas com e sem injúria foram fixados em solução de FAA, desaerados (utilizando-se bomba a vácuo) e desidratados. A desidratação foi realizada passando-se os discos de tecidos por soluções de álcool etílico, em concentrações que aumentavam progressivamente de 70% até, 100% a cada 48 horas. Em seguida, os discos foram transferidos para uma mistura (1:1) de álcool etílico 100% mais álcool t-butílico (clarificação); para álcool t-butílico puro; para a mistura (1:1) de álcool t-butílico e parafina, mantido a 56°C e finalmente, para parafina pura, a cada 24 horas (34, 48 e 67). Os tecidos foram seccionados a 12 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 através de objetivas de 3.2, 10 e 20 e ocular de 40x.

Para identificação dos detalhes celulares, foi realizada a coloração Safranina-Fast Green, que cora em verde o citoplasma e a parede celular não lignificada e, em vermelho o núcleo, substâncias fenólicas e elementos lignificados, JENSEN (50).

Os compostos fenólicos foram identificados pelo

Nitroso Teste, descrito por REEVE (71), no qual o catecol e o ácido clorogênico coram-se de vermelho cereja escuro, que persiste por uma hora; os fenóis apresentam cor clara, o ácido tânico amarelo marrom e a mistura de fenólicos coram-se de vermelho cereja marrom.

A suberina foi investigada, utilizando-se a coloração com Sudan IV, descrita por RAWLINS & TAKAHASHI (70).

A formação de lignina foi investigada através da técnica de Azul de O-toluidina, SAKAI (79), na qual os tecidos lignificados e suberizados coram-se em azul-esverdeado, a mistura de fenólicos em azul, o citoplasma em púrpura e o DNA aparece em azul-esverdeado; do floroglucinol -HCL, FAULKNER & KIMMIS (31), onde tecidos lignificados coram-se de púrpura e do Verde Iodo - Vermelho Congo, DOP & GAUTIE (26), onde tecidos lignificados e suberizados coram-se de verde, e paredes não lignificadas coram-se de vermelho.

O amido foi identificado através de coloração com LUGOL.

3.10.1. Avaliação da intensidade de reação de coloração dos tecidos

A avaliação da intensidade da reação foi obtida através da comparação da coloração produzida nas lâminas preparadas a partir de diferentes períodos de tempo de cura com lâminas dos

tecidos sem ferimento e tecidos com injúria de 0 hora de cura de ferimento. A comparação foi auxiliada com confecção de "slides" à partir das lâminas observadas.

3.11. Análise Estatística

Para os parâmetros considerados: a) estudo de resistência dos frutos injuriados e curados, ao Penicillium digitatum e b) perda de peso dos frutos (ensaio 2), 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 a ação enzimática foram submetidos a análise de regressão (linear, quadrática e cúbica), verificando-se a que melhor se ajustava aos dados.



Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

0.11. Anstaltsverwaltung

Main body of faint, illegible text, likely containing the primary content of the document.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises físicas, químicas e físico-químicas do fruto.

Os resultados das análises físicas, químicas e físico-químicas (Tabela 1), corresponderam às características normais da cultivar e estão coerentes com os dados apresentados anteriormente por CHITARRA (23), que analisou frutos de laranja 'Valencia' cultivados na mesma região.

4.2. Influência da temperatura e do tempo de cura no processo de resistência ao patógeno.

Através da Figura 4, observa-se que os frutos do tratamento controle, isto é, feridos mecanicamente e inoculados com suspensão de esporos de P. digitatum, imediatamente após o

ferimento, apresentaram crescimento rápido do patógeno, notadamente entre o 5º e o 9º dia de armazenamento. Nesse período, a incidência de lesões aumentou de aproximadamente 10% para 80%.

O efeito do tempo de cura do ferimento antes da inoculação, independentemente da temperatura, foi bastante acentuado nos frutos de todos os tratamentos, os quais se mantiveram sadios até o 5º dia de armazenamento.

Após esse período, foram observadas diferenças significativas na incidência de lesões. Os frutos submetidos a uma cura de ferimento mais prolongada mostraram-se mais resistentes à infecção durante o armazenamento.

A elevação da temperatura a 30°C, durante a cura do ferimento, teve pouca ou nenhuma influência na supressão da infecção dos frutos, ocorrendo efeito positivo apenas nos frutos submetidos à cura de ferimento por 24 horas (Figura 4 a). Esse tempo de cura, no entanto, foi pouco efetivo na indução da resistência dos tecidos à infecção durante o armazenamento. Aos 9 dias de armazenamento, 30% dos frutos já se apresentavam infectados, aumentando esse valor para cerca de 70% no 17º dia. A cura do ferimento foi, porém, altamente significativa sobre a resistência dos tecidos à infecção, quando realizada por 40 horas e por 72 horas (Figuras 4b e 4c). Nesses tratamentos, os frutos mantiveram-se praticamente sadios até o 9º dia de armazenamento. A partir daí, o aparecimento de lesões foi gradual, porém menos acentuados nos frutos curados por 72 horas sob temperatura ambiente. No 13º dia de armazenamento, 90% desses frutos encontravam-se íntegros, contra apenas 83% e 36% respectivamente,

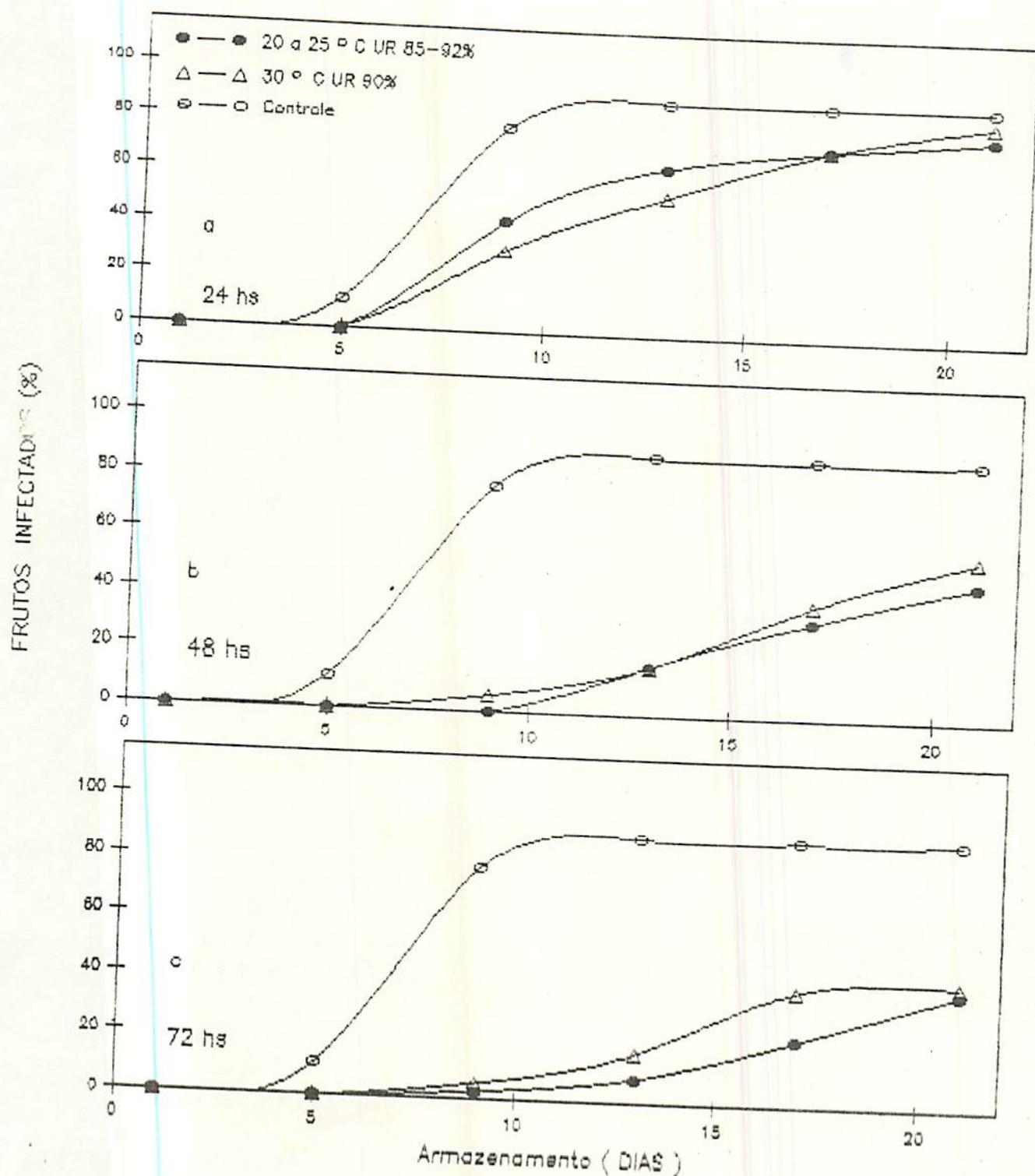


FIGURA 04. Resistência da laranja 'Valencia' ao ataque do *P. Digitatum* submetida a cura de fermento por diferentes tempos e condições de temperatura e umidade relativa, inoculada e armazenada sob temperatura ambiente.

daqueles curados por 48 e 24 horas.

Vários fatores podem estar envolvidos na capacidade de penetração ou não de P. digitatum nas células de flavedo. KAVANA-GH & WOOD (52), estudando a influência de local e profundidade da injúria de laranjas ao P. digitatum observaram que laranjas infectadas com o fungo, apenas desenvolveram a doença, quando os esferos foram colocados em injúrias que rompiam as glândulas de óleo ou se aprofundaram até a parte mais interna da casca (albedo). A provável explicação para esse fato seria a liberação de pectinas que estimulam a produção de enzimas pécticas pelo fungo, facilitando sua penetração e o desenvolvimento da lesão, KAVANA-GH & WOOD (51).

No presente trabalho, entretanto, o tempo de cura de ferimento indicou ser o fator mais fortemente relacionado ao processo de resistência. BROWN et alii (18), testando diferentes períodos para desverdecimento de laranjas injuriadas, sob condições de alta temperatura e umidade relativa, constataram que os frutos curados por 72 horas, seguidos de inoculação com P. digitatum apresentavam os menores índices da doença. Os autores atribuíram esse resultado à formação de uma periderme de ferimento, que foi detectada histoquimicamente após 48 horas de cura. Em maçãs armazenadas a 5°C por 38 dias, e a 20°C por 14 dias, com posterior inoculação, observou-se altos níveis de resistência dos frutos ao P. expansum e a B. cinerea. Na região da injúria ocorreu um espessamento evidente das paredes celulares e os testes histoquímicos empregados para lignina foram positivos. Entretanto, em apenas 4 dias de ferimento, durante o armazenamento a 5°C, os frutos já apresentavam aumento de resis-

tência às doenças. Nesse caso, a resistência não foi atribuída diretamente ao acúmulo de lignina e formação da periderme de ferimento por ser este um processo mais lento, e sim, a um aumento na concentração de compostos fenólicos, atuando possivelmente como substâncias fungitóxicas, LAKSHMINARAYANA et alii (58).

4.3. Perda de Peso

Durante o período de armazenamento dos frutos, ocorreu perda de peso gradual em todos os tratamentos. Ao final do período experimental (22 dias de armazenamento) os valores médios de perda de peso variavam entre 10 e 14% (Figura 5). Apenas os frutos curados a 30°C, por 72 horas tiveram perda acima de 16%, o que lhes conferiu redução na aparência devida ao enrugamento e endurecimento da casca. Essa perda na qualidade foi bastante evidente a partir do 17º dia de armazenamento.

A alta umidade relativa mantida durante a cura e, posteriormente, no armazenamento, possibilitou uma maior retenção de umidade pelos frutos, sendo, no primeiro dia de armazenamento, a média de perda de peso inferior a 1%, permanecendo relativamente baixa até o 5º dia (2,5 e 4,0%), período inicial das infecções nos frutos inoculados. Pode-se assim considerar que a alta umidade relativa teve uma grande influência no processo de cura, evitando-se a dessecação do tecido e permitindo a intensificação da atividade metabólica nos sítios vizinhos à área danificada,

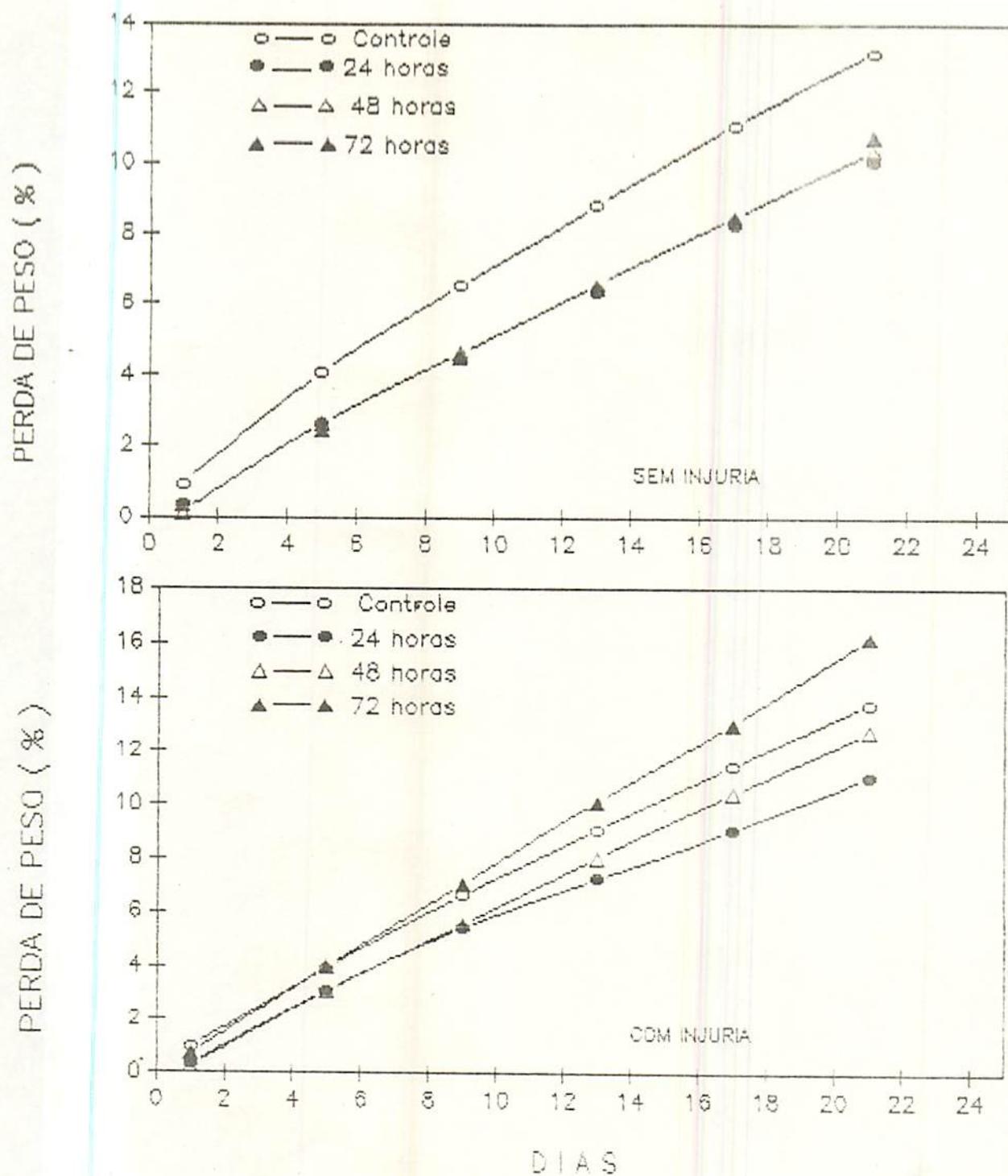


FIGURA 05. Porcentagem média de perda de peso da laranja 'Valencia' após cura de fermento a 30°C e 90% UR, armazenada sob temperatura ambiente (T 20-25°C, UR 85-92%).

BROWN et alii (18) e GOLOMB et alii (37). Condições de alta temperatura e umidade relativa estimulam o processo de cura de ferimento, BEN-YEHOSHUA et alii (7), e lignificação nos tecidos injuriados, funcionando como uma barreira física à penetração das hifas do patógeno, VERNENGHI & RAVISE (85), VANCE et alii (83), HAMMERSCHIMDIT & KUL (42). No caso de perda excessiva d'água, a resistência poderia ser atribuída à desidratação dos tecidos, impedindo o fornecimento de umidade suficiente para a germinação dos esporos.

Segundo PASSAN & BLUNDEN (69) limões Taiti, conservados sob condições de temperaturas tropicais, chegam a perder 1 a 2% de seu peso por dia, deteriorando-se bastante em qualidade quando as perdas atingem 12 a 14%. Para laranjas 'Valencia', a perda de peso tolerada é de 12%, FANTASTICO (68). Contudo, a maior parte dos tratamentos não atingiu esse patamar. Os frutos que ultrapassaram 12% na perda de umidade, alcançaram esse índice somente a partir do 17º dia de armazenamento, embora as condições de temperatura ambiente tenham sido consideradas relativamente elevadas devido à época de realização do experimento.

4.4. Atividade da FAL.

Houve tendência de aumento linear na atividade da FAL nos frutos, até 96 horas de cura de ferimento com maiores valores naqueles submetidos à cura sob temperatura igual a 30°C e UR 90% (Figura 6). Nos frutos não injuriados, a atividade dessa enzima não foi significativa durante o período experimental, mesmo nos frutos mantidos a 30°C.

Elevações na atividade da FAL acarretam um aumento nas concentrações de compostos fenólicos no decorrer do período de cura, (8,40 e 63). VANCE & SHERWOOD (84), detectaram uma elevação de aproximadamente 2 vezes nas atividades da FAL, hidróxicinamato: CoA ligase e peroxidase, paralelo à indução da lignificação em "capim amarelo" (Phalaris arundinacea) inoculados com Helminthosporium avenae. Resultados semelhantes, associando-se o acúmulo de compostos lignificantes ao aumento na concentração da FAL, foram observados por vários autores (11, 12, 13 e 14). GOLOMB et alii (37), observaram que a atividade da FAL, no flavedo de pomelos injuriados, atingia um pico máximo após 72 horas, depois do qual os níveis da enzima começavam a decrescer. ISMAIL & BROWN (48), constataram uma perda da atividade da enzima após 24 horas de cura de ferimento em laranjas 'Valencia' inoculadas, embora nos frutos injuriados não inoculados, a atividade da FAL tenha permanecido em elevação até 72 horas de cura. Segundo Minakawa & Uritani citados por TOURINO (81), tanto o tempo de formação, quanto a ativação desta enzima (FAL), estão intimamente ligados à síntese de polifenóis após a injúria mecânica e/ou infecção em raiz de batata doce. Dessa forma, pode-se considerar que o aumento da atividade da FAL, seguido de um acúmulo de compostos fenólicos, sejam uma resposta da laranja 'Valencia' à injúria mecânica. ISMAIL & BROWN (48), relataram aumentos nas concentrações de compostos fenólicos livres, até 96 horas após a injúria, associado a intensa atividade enzimática, os quais foram considerados resultantes da cura ativa que se seguiu ao ferimento. Esses mesmos autores também observaram que o fruto não injuriado não

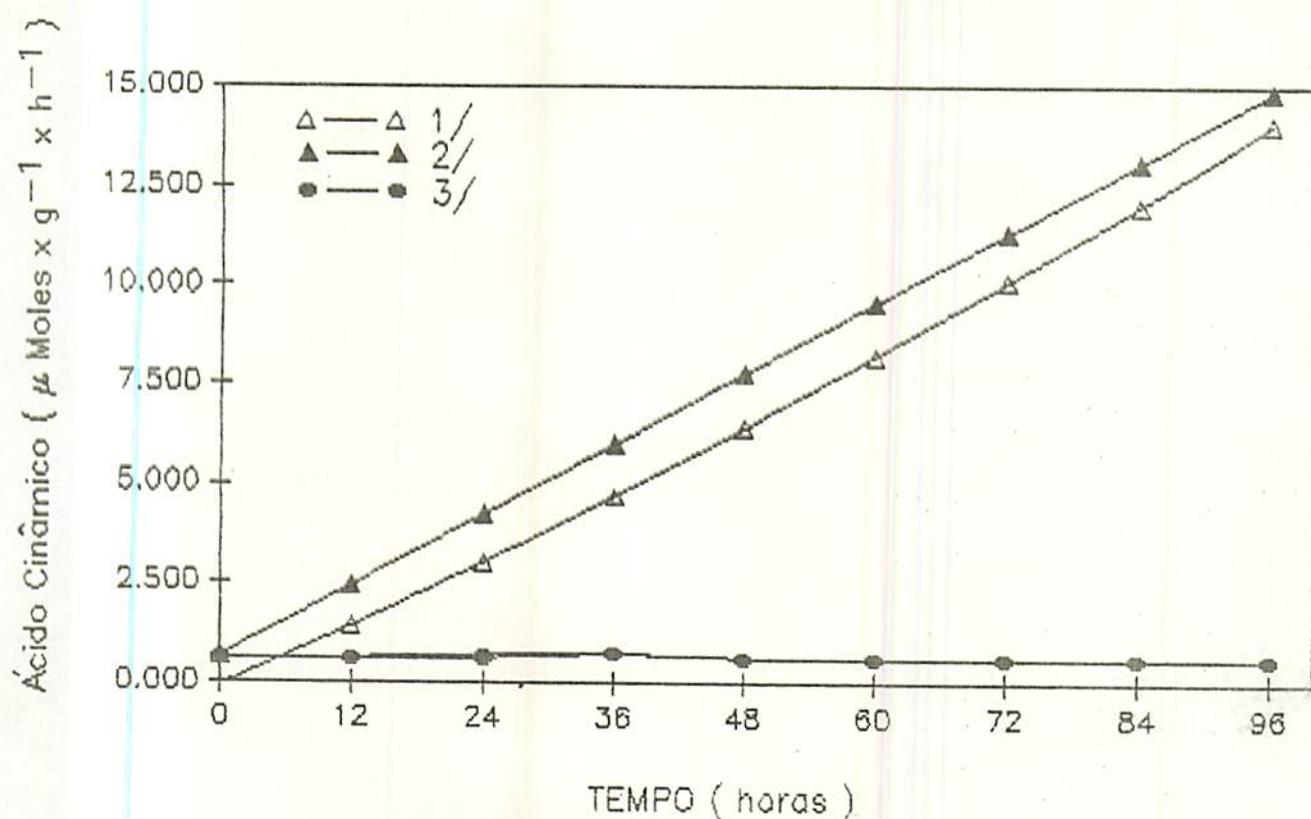


FIGURA 06. Atividade da Fenilalanina amônia liase na casca da laranja 'Valencia' submetida ou não a cura de fermento sob diferentes temperaturas.

1/ cura de fermento a 20-25^o C, UR 85-92%.

$$y = -0.427 + 0.147x \quad R^2 =$$

2/ cura de fermento a 30^o C, UR 90%

$$y = 0.662 + 0.148x \quad R^2 =$$

3/ frutos íntegros (controle) mantidos a 20-25^o C ou a 30^o C.

apresentava aumento da FAL, estando esses resultados coerentes com os obtidos no presente trabalho.

Vários fatores podem influenciar na atividade da FAL, CAMM & TOWERS (20), sendo a injúria dos tecidos um importante estímulo à elevação da enzima, BROWN (12) e BROWN et alii (18).

4.5. Ensaio histoquímico

O Nitroso teste, REEVE (69), específico para compostos fenólicos, indicou o acúmulo de fenólicos totais ao redor do ferimento a partir de 24 horas de cura, intensificando levemente até 96 horas após a injúria. (Tabelas 2 e 3). É possível que tenha ocorrido a interferência de alguma substância existente no próprio material estudado (epicarpo e mesocarpo da laranja), a qual inibiu a reação de coloração dos fenólicos pelo Nitroso teste. Essa coloração é tradicionalmente usada para detecção de fenólicos e apresentou resultados positivos em outros materiais utilizados anteriormente, TOURINO (79). Empregando o teste Azul de O-toluidina, SAKAI (77) detectou-se acúmulo de compostos fenólicos a partir de 12 horas de cura (Figura 8b), sendo esse resultado confirmado pela coloração Safranina Fast-Green JENSEN (49), empregada para definição de detalhes celulares, a qual também indicou a presença de fenólicos a partir de 12 horas de cura de ferimento.

Para os dois últimos testes, após 72 horas de cura, a reação foi bastante intensa até a sexta e sétima camadas de células adjacentes à injúria (Figura 7b). Conforme vários autores

(2, 5, 13, 21 e 29), esses compostos podem ter atividades fungistática, inibindo o crescimento fúngico.

A detecção de lignina, através do teste com Floroglucinol-HCL, FAULKNER & KIMMIS (31), foi negativa em todos os tempos de cura de ferimento e temperatura utilizados neste ensaio. Outras colorações menos específicas como Azul de O-toluidina, SAKAI (79) e Verde Iodo-Vermelho Congo, DOP & GAUTIE (26) apresentaram resultados positivos. É possível que as reações positivas observadas sejam devidas à capacidade dessas substâncias reagirem com compostos fenólicos precursores da lignificação.

Neste ensaio, a não detecção da lignina nos tecidos foi contraditória com os resultados obtidos por (11, 17, 18, 48). Esses autores observaram reação positiva para lignina com Floglucinol-HCL a partir de 12 horas e formação de periderme de ferimento com 48 horas de cura, até a segunda e terceira camadas de células adjacentes à injúria.

Embora já, ao final da década de 70, houvesse a necessidade do desenvolvimento de testes mais específicos para uma melhor caracterização da lignificação, WEBSTER (87), até o presente, não foi estabelecido nenhum teste capaz de indicar a presença de lignina sob todas as formas. O Floroglucinol-HCL, parece reagir com os grupos finais cinamaldeído da lignina, GAHAN (35), entretanto, sob certas condições, esse teste pode acarretar erros devido à sua inespecificidade BRAUNS & BRAUNS (10). Friend et alii, citados por LEGRAND (59), estudaram a resposta de tubérculos de batata a infecção por Phytophthora infestans.

Observaram que, no caso da interação incompatível entre parasita-hospedeiro, ocorria uma rápida deposição de lignina quando comparada com a combinação susceptível. Esse material produziu p-hidroxibenzaldeído, vanilina e seringaldeído em oxidação alcalina com nitrobenzeno, mas não coloriu com nenhum corante tradicional para lignina.

Embora o fenômeno de cura isoladamente não tenha indicado a ocorrência de lignificação nos tecidos até 96 horas após a injúria, é possível que a inoculação tenha estimulado esse processo. Injúrias em limões, quando inoculadas algumas horas após o ferimento, tornaram-se resistentes ao Geotrichum candidum, BAUDOIN & ECKERT (05). O ataque fúngico estimulou a lignificação dos tecidos, apresentando maior concentração do polímero, relativo às feridas não inoculadas. Fenômeno similar foi observado em laranjas infectadas com P. digitatum, mas, neste caso, a resistência desenvolvida no flavedo ocorreu 2 a 3 dias após o ferimento, BROWN et alii (18). Neste ensaio, alguns frutos curados a 30°C por 72 horas apresentaram sinais visíveis de cura, exibindo uma pequena cicatriz no local da injúria. Essa reação ocorreu durante o armazenamento, 4 a 5 dias após a inoculação. Segundo Clarke; citado por GRISEBACH (39), os fungos patogênicos inibem o desenvolvimento de barreiras de lignina, por desviar os seus precursores para outras rotas metabólicas.

RIDE (73), observou que a síntese de lignina ocorria rapidamente em folhas de trigo injuriadas, infectadas com fungos

TABELA 2 Reações de coloração das paredes celulares de tecidos da casca da laranja 'Valencia' submetida ao processo de cura de fermento por diferentes espaços de tempo sob temperatura ambiente (20-25°C, UR 85-92%).

CORANTE	TESTE	TEMPO DE CURA DE FERIMENTO (h)									
		CNF	0	12	24	36	48	60	72	84	96
Nitroso teste	fenólicos	-	<	-	±	+	+	+	+	+	+
Azul de O-toluidina	fenólicos	<	<	+	+	+	++	++	++	++	++
Verde Iodo-Vermelho Congo	fenólicos	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
Floroglucinol-HCL	lignina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sudan IV	suberina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lugol	amido	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
Safranina Fast-Green (detalhes celulares)	fenólicos	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++

CNF Controle não ferido

Intensidade da reação

(-) - reação ausente ou idêntica ao CNF

(<) - reação significativa mas não associada a parede celular

(±) - reação positiva fraca

(+) - reação positiva

(++) - reação fortemente positiva.

TABELA 3 Reações de coloração das paredes celulares de tecidos da casca da laranja 'Valencia' submetida ao processo de cura de fermento por diferentes espaços de tempo sob temperatura 30°C, UR 90 %).

CORANTE	TESTE	TEMPO DE CURA DE FERIMENTO (h)									
		CNF	0	12	24	36	48	60	72	84	96
Nitroso teste	fenólicos	-	-	<	±	+	+	+	+	+	+
Azul de O-toluidina	fenólicos	<	<	<	+	+	++	++	++	++	++
Verde Iodo-Vermelho Congo	fenólicos	-	-	-	-	±	+	+	++	++	++
Floroglucinol-HCL	lignina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sudan IV	suberina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lugol	amido	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<

CNF Controle não ferido

Intensidade da reação

(-) - reação ausente ou idêntica ao CNF

(<) - reação significativa mas não associada a parede celular

(±) - reação positiva fraca

(+) - reação positiva

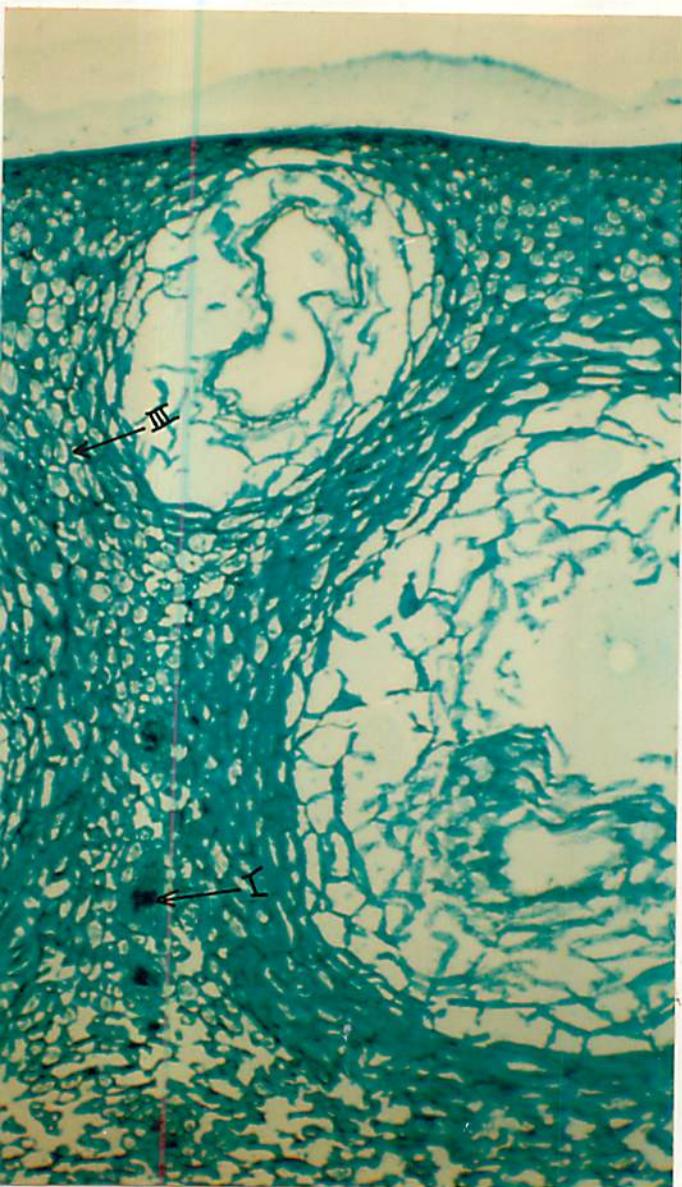
(++) - reação fortemente positiva.

não patogênicos. Quando essas injúrias eram posteriormente inoculadas com patógenos do trigo, o crescimento fúngico se restringia ao ferimento. Por outro lado, quando as injúrias eram imediatamente inoculadas com fungos patogênicos, a lignificação ocorria mais lentamente e o crescimento fúngico se estendia para outras partes do vegetal.

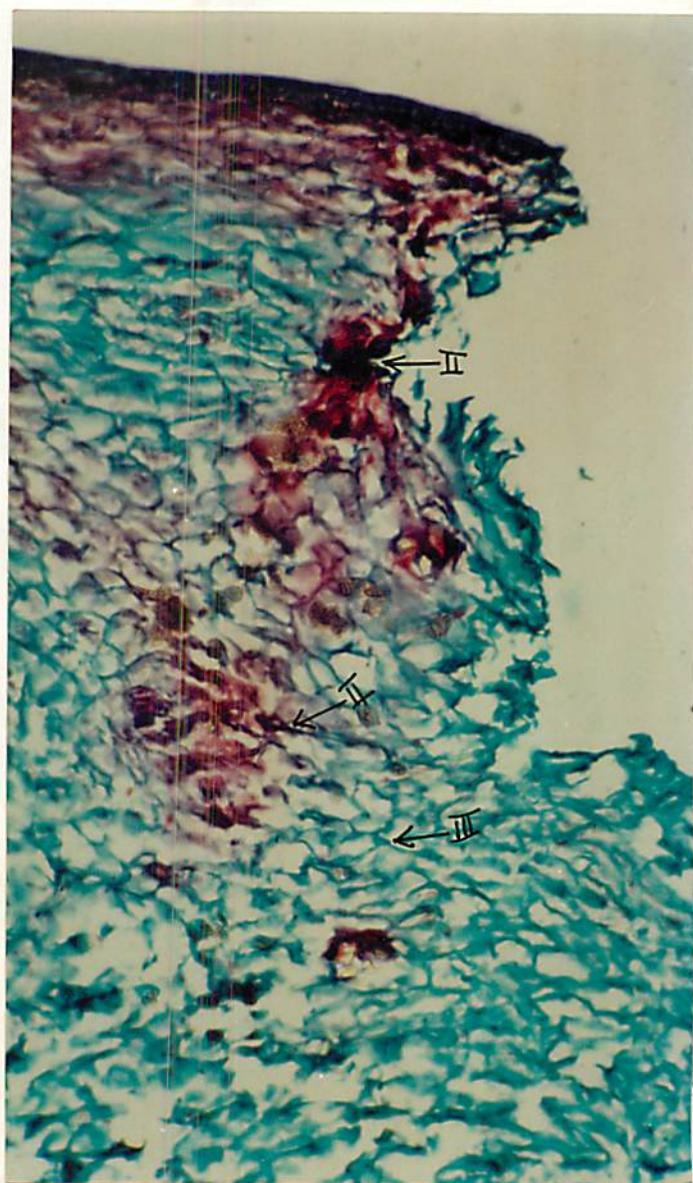
Embora nos trabalhos desenvolvidos previamente (16, 17, e 49) o acúmulo de substância lignificantes na região da injúria, após 48 horas de cura, tenha sido caracterizado como periderme de ferida, é provável que tenha ocorrido apenas um acúmulo de fenólicos. A segunda e terceiras camadas celulares adjacentes ao ferimento estão muito próximas das células rompidas, responsáveis pela liberação de vários componentes tóxicos. HEATH (43). Esses compostos, associados ao óleo liberado pelas glândulas rompidas da epiderme, provocam a necrose de várias células que estimulam um rápido acúmulo de fenólicos nessa região, VAN DER PLANK (82), DAYKIN & MILHOLLAND (25). Dessa forma, a lignificação possivelmente ocorre após um período mais longo de cura e apenas nas camadas mais distantes da área injuriada (1, 9, 74 e 88).

Grânulos de amido foram indicados em todos os tempos de cura em ambas as temperaturas, nos frutos injuriados ou não (Tabelas 2 e 3). As maiores concentrações estiveram na região do flavedo, não sendo possível detectar-se qualitativamente uma relação entre a presença do amido e a reação de cura de ferimento.

A suberização dos tecidos não ocorreu durante os períodos de cura ensaiados, conforme os resultados obtidos com o



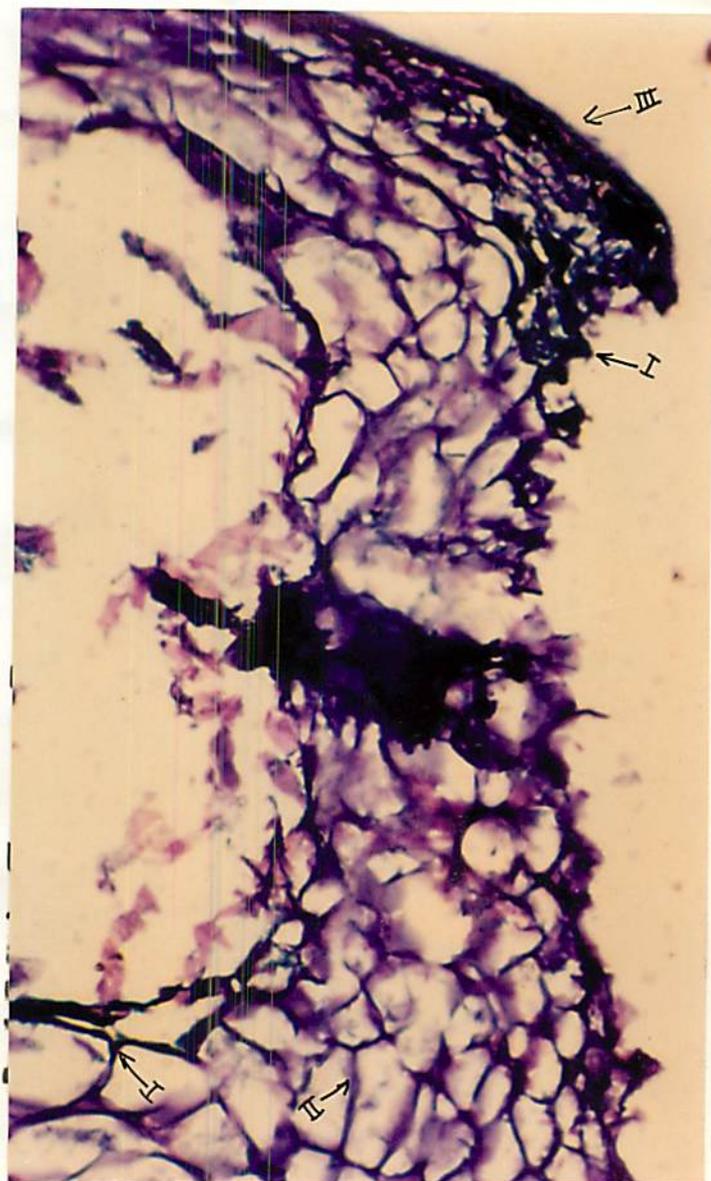
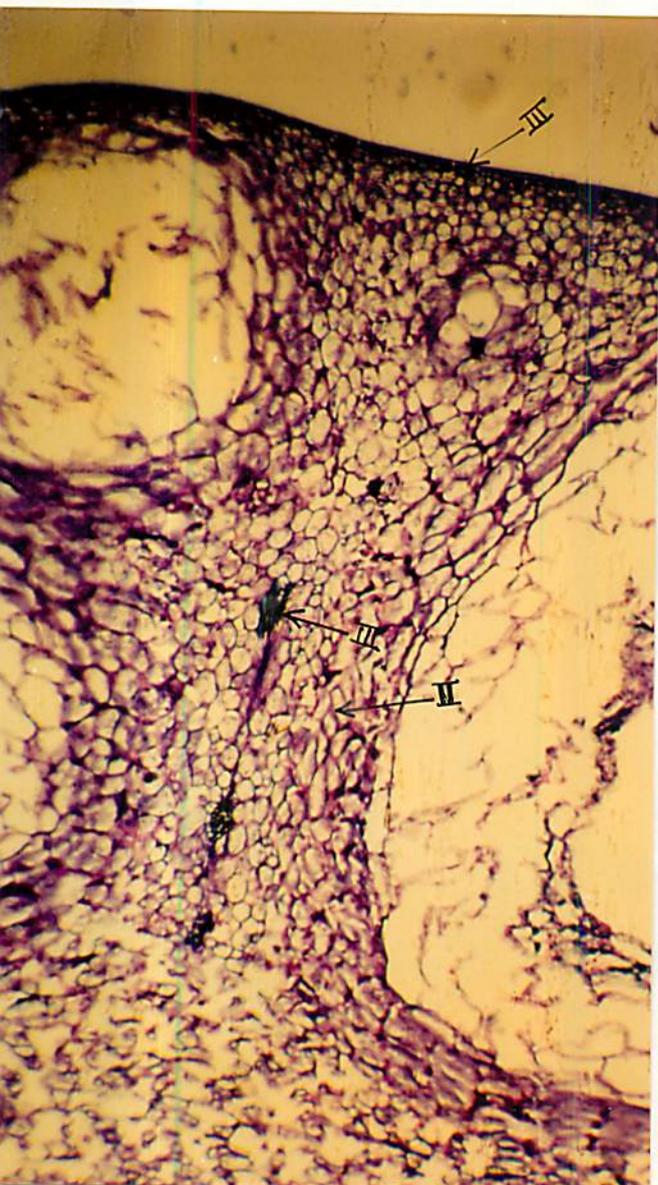
a



b

Figura 7 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de laranja pela coloração Safranina Fast-Green:

- a) tecidos sem injúria - aumento de 54x;
- b) tecidos com injúria após 48 horas de cura - aumento de 200x; indicando: I elementos lignificados, II - mistura de fenólicos, III - paredes celulares não lignificadas.



b

Figura 8 - Fotomicrografia da secção de tecidos do epicarpo e mesocarpo de laranja pela coloração Azul de O-toluidina:

- a) tecidos sem injúria - aumento de 54x;
 b) tecidos com injúria, após 36 horas de cura - aumento de 200x; indicando: I substâncias fenólicas, II - paredes celulares não lignificadas, III - cutícula

uso do Sudan IV. Da mesma forma que para o processo de lignificação, é possível que os intervalos de tempo estudados, tenham sido insuficientes para a detecção de suberina. Segundo KOLATTUKUDY (54), o acúmulo de compostos fenólicos é uma das etapas necessárias para a síntese desse polímero. RITTINGER et alii (77), estudando o acúmulo de lignina e suberina em várias espécies de plantas e em diferentes órgãos vegetais, observaram que, nas espécies estudadas que se tornaram lignificadas e suberizadas, o processo de lignificação precedia a suberização.

5. CONCLUSÕES

De acordo com as condições experimentais utilizadas, pode-se concluir que:

1 - A maior resistência dos tecidos ao ataque do Penicillium digitatum ocorreu após 72 horas de cura de ferimento.

2 - A perda de peso dos frutos não sofreu influência da temperatura e tempo de cura de ferimento, permanecendo dentro dos limites aceitáveis até o 16º dia de armazenamento.

3 - O ferimento acarretou um aumento linear na atividade da FAL até 96 horas de cura de ferimento.

4 - A injúria mecânica estimulou um aumento de 6 vezes na atividade da enzima, até 96 horas de cura de ferimento.

5 - A resposta de resistência do hospedeiro ao ataque do patógeno foi detectada pelos testes histoquímicos como sendo primariamente devida a um acúmulo de compostos fenólicos.

6 RESUMO

Objetivou-se verificar a influência da temperatura e do tempo sobre o mecanismo de cura de ferimento em casca de laranja 'Valencia' (Citrus sinensis L Osbeck) e sua relação no processo de resistência à podridão pós-colheita, causada pelo fungo Penicillium digitatum Sacc. As laranjas foram injuriadas assepticamente, com auxílio de estilete e submetidas ao processo de cura de ferimento por 24, 48 e 72 horas sob: a) temperatura ambiente (20-25°C) e 85%-92% UR e b) 30°C e 90% UR. Posteriormente, os frutos foram inculados no local de ferimento, com uma suspensão de esporos (2×10^6 esporos/ml) do patógeno e armazenados sob as condições do item a.

Foram realizadas contagens de frutos com desenvolvimento de lesões, bem como controle de perda de peso. Após 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas de cura de ferimento, foram retirados discos de tecidos ao redor das injúrias para ensaio da

atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) e para os ensaios histoquímicos quanto à síntese de compostos fenólicos, lignina, suberina e amido, nas paredes das células adjacentes à injúria.

Os resultados demonstraram que a maior resistência dos tecidos ao ataque do P. digitatum, ocorreu após 72 horas de cura de ferimento. A injúria mecânica estimulou a atividade da FAL em 6 vezes, até 96 horas para ambas as temperaturas de cura. A resistência dos frutos pode ser atribuída, através dos estudos histoquímicos, primariamente à síntese de compostos fenólicos nas camadas de células adjacentes ao ferimento.

7. SUMMARY

Post harvest resistance of 'Valencia' orange to Penicillium digitatum influenced by temperature and wound healing time.

The aim of this research was to verify the influence of temperature on the mechanism of wound healing in 'Valencia' orange peel (Citrus sinensis L Osbeck) and the relation with the resistance to the post harvest rot caused by Penicillium digitatum. Oranges were mechanically pinched aseptically, with a special pin and left for healing at a) room temperature (20-25°C and 85-92% R.H.) and b) 30°C and 90% R.H. by 24, 48, 72 hours. After healing, the fruits were inoculated at injury site, with spores of P. digitatum (2×10^6 spores/ml) suspended in distilled water and held at room temperature and 85-92% R.H. Fruits that developed lesions were counted as well, their lost of

weight. Discs were taken from wounded tissues without inoculation at, 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 hours after healing and analyzed for phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and histochemical assay was performed to detect phenolic compounds, lignin, suberin and starch.

Results showed that a higher tissue resistance to P. digitatum occurred at 72 hours of wound healing. The mechanically injury enhanced PAL activity for both heal temperatures. The fruits resistance should be related, through histochemical studies, at first instance to phenolic compounds synthesis at injury adjacent cell layers.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AIST, J.R. Papillae and related wound plugs of plant cells. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 14:145-63, 1976.
2. AMPOMAH, 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.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official and tentative methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 2. ed. Washington, 1970. 205p.
4. BATEMAN, D.F. An induces mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in Rhizoctonia infected hypocotyls of bean. Phytopathology, St. Paul, 54:438-45, 1964.

5. BAUDOIN, A.B.A.M. & ECKERT, J.W. Development of resistance against Geotrichum candidum in lemon peel injuries. Phytopathology, St. Paul, 75:174-79, Feb. 1985.
6. BEHR, R.M. & FAIRCHILD, G.F. 1988-89 citrus outlook for Brazil. The Citrus Industry, Bartow, 69(8):30-6, Aug. 1988.
7. 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.
8. BORCHERT, R. Time course and spacial distribution of phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activity in wounded potato tuber tissue. Plant Physiology, Washington, 62:789-93, July 1978.
9. BOSTOCK, R.M. & STERMER, B.A. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 27:343-71, 1989.
10. BRAUNS, E.M. & BRAUNS, D.A. The chemistry of lignin-supplement volume, London, Academic Press, 1960. 804p.
11. BROWN, G.E. Development of green mold in degreened oranges. Phytopathology, St. Paul, 63:1104-7, Sept. 1973.

12. BROWN, G.E. Factors affecting postharvest development of Collectotrichum gloeosporioides in citrus fruits. Phytopathology, St. Paul, 65:404-9, Apr. 1975.
13. _____. Hypersensitive response of orange-colored Robinson tangerines to Collectotrichum gloeosporioides after ethylene treatment. Phytopathology, St. Paul, 68:700-6, May 1978.
14. _____. Postharvest decays of Florida citrus The Citrus Industry, Bartow, 69(6): 31-7, June 1988.
15. _____ & BARMORE, C.R. The effect of ethylene on susceptibi-lity of Robinson tangerines to antracnose. Phytopathology, St. Paul, 67:120-3, Jan. 1977.
16. _____ & _____. Resistance of healed exocarp to penetration by Penicillium digitatum. Phytopathology, St. Paul, 73:691-44, Dec. 1982.
17. _____ & _____. Ultrastructure of the response of citrus epicarp to mechanical injury. Botanical Gazette, Chicago, 142(4) 477-81, Dec. 1981.
18. _____. ISMAIL, M.A. & BARMORE, C.R. Lignification of injuries of citrus fruit and susceptibility to green mold. Proceeding of the Florida State Horticultural Society, Deland, 91:124-6, 1978.

19. BRUNE, W; BATISTA, C.M. SILVA, D.O.; FORTES, J.M. & PINHEIRO, R.V.R. Sobre o teor de vitamina C em mirtáceas. Revista Ceres, Viçosa, 13(74):123-33, ago/set. 1966.
20. CAMM, E.L. & TOWERS, N. Phenylalanine ammonia-lyase - review article. Phytopathology, Elmsford, 12:961-73, Dec. 1973.
21. CHAREST, P.M.; QUELLETE, G.B. & PAUZE, F.J. Cytological observation of early infection process by Fusarium oxysporum f.sp. racislycopersici in tomato plants. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 62(6):1232-44, June 1984.
22. CHEMICAL in citruculture: options and alternatives. Citograph, Fresno, 73(9): 172-82, 189, July 1988.
23. CHITARRA, M.I.F. Características físicas, físico-químicas e químicas de alguns frutos cítricos cultivados em Minas Gerais. São Paulo, USP, 1979. 185p. (Tese Doutorado).
24. 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.
25. DAYKIN, M.E. & MILHOLLAND, R.D. Histopathology of ripe rot caused by Collectotrichum gloeosporioides on muscadine grapes. Phytopathology, St. Paul, 74 (11):1339-41, Nov. 1984.

26. DOP, P. & GAUTIE, A. Manuel de technique botanique. Paris, J. Lamarre editeur, 1928. 523p.
27. ECKERT, J.W. Control of postharvest diseases In: SIEGEL, M.R. & STSTER, H.D., eds. Antifungal Compounds. Marcel Dekker, 1977. v.1, 600p.
28. _____ & SOMMER, N.F. Control of diseases of fruits and vegetables by postharvest treatments. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 5:391-432, 1967.
29. EL-KAZZAS, M.K.; CHORDÁS, A. & KADER, A.A. Physiological and compositional changes in orange fruit in relation to modification of their susceptibility to Penicillium italicum by ethylene treatments. Journal of the American Society for Horticultural Science, Mount, 108(4): 618-21, Apr. 1983.
30. FAJAC, F. Les fruits tropicaux et les agrumes aux Etats-Unis. Fruits, Paris, 34(1):53-63, Jan. 1979.
31. 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: 1396-1400, 1975.

32. FLEURIET, A.; DELOIRE, A. Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrization des fruits de tomate blessés. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie, Stuttgart 107: 259-68, Sept. 1982.
33. FRIEND, J. Biochemistry of plant pathogen In: International Review of Biochemistry - Plant Biochemistry II. Baltimore, University Park Press, 1977. v.15, 262p.
34. FUNDAÇÃO GETULIO VARGAS. Laranja Agroanalysis, Rio de Janeiro, 12(2):28-33, 1988.
35. GAHAN, p.s. Plant histochemistry and citochemistry. New York, Academic Press, 1984. 301p.
36. GALLI, F. Manual de fitopatologia: doenças de Plantas Cultivadas. São Paulo, Ceres, 1980.v.2, 587p.
37. GOLOMB, A.; BEN-YEHOSHUA, S. & SARIG, 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.
38. GOMES, R.P. Fruticultura brasileira. São Paulo, Nobel, 1981. 446p.

39. GRISEBACH, H. Lignins. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. ed. The biochemistry of plants. New York, Academic Press, 1981. v.7, p.457-78.
40. HABEREDER, H.; SCHOPEDER, G. & EBEL, S. Rapid Induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (Glycine max L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis. Planta, Berlin, 177(1):58-65, Jan. 1989.
41. HAHLBROCK, K; LAMB, C.J.; PURWIN, C.; EBEL, J. FAUTZ, E. & SCHAFER, E. Rapid reponse of suspension-cultured parsley cells to the elicitor from Phytophthora megasperma var sojae. Plant Physiology, Washington, 67:768-73, 1981.
42. HAMMERSCHMIDT, R. & KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance of cucumber. Physiological Plant Pathology, London, 20:61-71, 1982.
43. HEATH, M.C. Hipersensitivity, the cause or the consequence of rust resistance? - letter to the editor. Phytopathology, St. Paul, 66:935-6, 1976.
44. HIGBY, W.K. A simplified method for determination of some aspects of the carotenoid distribution in natural and carotenoid fortified orange juice. Journal of Food Science, Chicago, 27(1):42-9, 1962.

45. HYODO, H.; KURODA, H. & YANG S.F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase of phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. Plant Physiology, Washington, 62(1):31-5, July 1978.
46. _____ & YANG, S.F. Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in pea seedlings. Plant Physiology, Washington, 47(6):765, June 1971.
47. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas e técnicas de métodos físicos e químicos de alimentos In: _____. Normas de qualidade para alimentos. São Paulo, 1967. n.1, p.10-3.
48. 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.
49. _____ & _____. Postharvest wound healing in citrus fruit: induction of phenylalanine ammonia-lyase in injured 'Valencia' orange flavedo. Journal of the American Society for Horticultural Science, Mount, 104(1): 126-29, Jan. 1979.
50. JENSEN, N.A. Carbohydrates and cell wall constituents In: _____. Botanical histochemistry. San Francisco, W.H. Freeman, 1962. p.198-206.

51. KAVANAGH, J.A. & WOOD, R.K.S. Green mould of orange caused by Penicillium digitatum Sacc; effect of additives on spore germination and infection. Annals of applied Biology, London, 67:35-44, 1971.
52. _____ & _____. The hole of wounds in the infection of oranges by Penicillium digitatum Sacc. Annals of applied Biology, London, 60:375-83, 1967.
53. KLOTZ, L.J. Color handbook of citrus diseases. Davis, University of California, 1973. 121p.
54. KOLATTUKUDY, P.E. Biochemistry and function of cutin and suberin. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 62(12): 2918-33, Dec. 1984.
55. _____. Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 32: 539-67, 1981.
56. KOUKOL, J. & CONN, E.E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 236(10):2692-8, 1961.
57. KUC, J. Phytoalexins. Annual Review of Phytopathology, St. Paul, 10:207-32, 1972.

58. LAKSHMINARAYANA, S; SOMMER, N.F., POLITO, V. & FORTLAGE, R.J.
Development of resistance to infections by Botrytis cinerea
and Penicillium expansum in wounds of mature apple fruits.
Phytopathology, St. Paul, 77:1674-8, 1987.
59. LEGRAND, M. Phenylpropanoid metabolism and its regulation in
disease. In: CALLOW, J.A., ed. Biochemical Plant Pathology.
New York, John Wiley & Sons, 1983.p.367-83.
60. LETOURNEAU, D.; MACLEAN, J.G. & GUTHRIE, J.W. Effects of some
phenoles on growth in culture of Verticillium albo-atrum.
Phytopathology, St. Paul, 46(11):638, 1956.
61. _____; _____ & _____. Effects of some phenoles and qui-
nones on growth in vitro of Verticillium albo-atrum.
Phytopathology, St. Paul, 47(10):602-6, 1957.
62. LIN, T.S. & KOLATTUKUDY, P.E. Isolation and characterization of
a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from
phytopathogenic fungi. Physiological Plant Pathology,
London, 17:1-15, 1980.
63. LISKER, N.; COHEN, L.; CHALUTZ, E & FUCH S.Y. Fungal infections
suppress ethylene-induced phenylalanine ammonia-lyase
activity in grapefruits. Physiological Plant Pathology,
London, 22:331-8, 1983.



64. McCUE, K.F. & CONN, E.E. Induction of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase activite by fungal elicitor in cultures of Petroselinum crispum. Proceedings of the National Academic Science of United States of America, 86:7374-7, Oct. 1989.
65. MOERCHBACHER, B.M.; NOLL, V. GORRICHON, L. & REISNER, H.J. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. Plant Physiology, Bethesda, 93(2):465-70, June 1990.
66. NELSON, N.A. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 135:136-75, 1944.
67. O'BRIAN, T.P. & McCULLY, M.E. The study of plant structure, principles and selected methods Termarcarpi, Pty. Melbourne, 1981. 1000p.
68. PANTASTICO, E.B. Postharvest physiology, handling and utilization of tropical and subtropical fruits and vegetables. Westport Connecticut, AVI Publissing, 1975. 559p.
69. PASSAN, H.C. & BLUNDEN, G. Experiments on the storage of limes at trpical ambient temperature. Tropical Agriculture, Trinidad, 59(1):20-4, Jan. 1982.

70. RAWLINS, T.E. & TAKAHASHI, W.N. Technique of plant histochemistry and virology. Milbrae, The National Press, 1952. 125p.
71. REEVE, R.M. Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. Stain Technology, Baltimore, 26:(2):91-6, Apr. 1951.
72. RHODES, M.J.C. Enzyme activities and post harvest change In: LIEBERMAN, M., ed. Post harvest physiology and Crop Preservation. New York, Plenum Press, 1983. p.111-21.
73. RIDE, J.P. Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. Physiological Plant Pathology, London, 5:125-34, 1975.
74. _____. The role of cell wall alterations in resistance to fungi. Annals of applied Biology, Palo Alto, 89:302-6, 1978.
75. RIOV, J.; MONSELISE, S.P. & KAHAN, R.S. Effects of gamma radiation on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of phenolic compounds in citrus fruit peel. Radiation Botany, New York, 8:463-6, 1968.
76. _____; _____ & _____. Ethylene-controlled induction of phenylalanine ammonia-lyase in citrus fruit peel. Plant Physiology, Washington, 44(5):631-5, May 1969.

77. RITTINGER, P.A.; BIGGS, A.R. & PEIRSON, D.R. Histochemistry of lignin and suberin deposition in boundary layers formed after wounding in various plant species and organs. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 65(9):1886-92, Sept. 1987.
78. ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. & KLIENER, W.M. Phenylalanine ammonia lyase in berries of Vitrus unifera L; extraction and possible sources of error during assay. American Journal of Enology and Viticulture, California, 36(4):314-5, Apr. 1985.
79. SAKAY, W.S. Simple methods for differential staining of paraffin embedded plant material using Toluidine Blue. Stain Technology, Baltimore, 48:247-9, 1973.
80. STANGHELLINI, M.E. & ARAGAKI, M. Relation of periderm formation and callose deposition to antracnose resistance in papaya fruit. Phytopathology, St. Paul, 56:444-50, 1966.
81. 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).
82. VAN DER PLANK, J.E. Disease Resistance in Plants. New York, Academic Press, 1968. 206p.

83. 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.
84. _____; _____ & _____. Regulation of lignin formation in reed Canarygrass in relation to disease resistance. Plant Physiology, Bethesda, 57:915-9, 1976.
85. VERNENGI, A. & RAVISE, A. Stimulation de la reaction de défense de la tomate contre le Phytophthora parasitica par le phosetyl - Al et par des éliciteurs fongiques. Fruits, Paris, 40 (7/8):495-02, july/aug. 1985.
86. WALTER JR, W.M.; RANDALL-SCHADEL, B & SCHADEL, W.E. Wound healing in cucumber fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science, Mount, 115(3):444-52, Mar. 1990.
87. WEBSTER, B.D. Lignin identification-letter to the editor. HortScience, Alexandria, 14(6):687, Dec. 1979.
88. WHEELER, H. Cell wall and plasmalemma modifications in disease and injured plant tissues. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 52(5): 1005-9, May 1974.
89. ZUCKER, M. Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and a lyase inactivating system in potato tuber disks. Plant Physiology, Washington, 43(3): 365-74, Mar. 1968.

A P P E N D I C E

QUADRO 1 - Análise da Variância para percentagem de frutos que não desenvolveram doença, inoculadas com Penicillium digitatum após injúria seguida de diferentes tempos de cura.

Causas de Variação	GL	QM	Nível Significância.
Dias	5	18501,3593	0,0000%
Tratamento	6	7634,3339	0,0000%
D x T	30	778,1314	0,0000%
Trat: D(1)	6	0,0000	-----
Trat: D(5)	6	67,3958	-----
Trat: D(9)	6	3301,1625	-----
Trat: D(13)	6	3815,6457	-----
Trat: D(17)	6	2504,9245	-----
Trat: D(21)	6	1835,9595	-----
Erro	126	16,9026	-----

QUADRO 2 Análise de Variância para fenilalanina amônia-liase, estudando o efeito dos tempos de cura em frutos de laranjas "Valencia" injuriadas mecanicamente, submetidas a duas temperaturas de cura de fermento.

Causas de Variação	GL	QM	Nível Significância.
Horas	8	70,8487	0,0000%
Tratamento	3	394,3269	0,0000%
H x T	24	24,9471	0,0000%
Horas A(1)	8	0,007052	-----
Horas A(2)	(8)	71,5396	-----
R. Linear)	1	561,7999	-----
R. Quadrática	1	1,2034	-----
R. Cúbica	1	6,2322	-----
Desvios Regres (5)		0,6163	-----
Horas A(3)	8	0,004376	-----
Horas A(4)	(8)	74,1389	-----
R. Linear	1	567,1480	-----
R. Quadrática	1	3,7677	-----
R. Cúbica	1	0,5942	-----
Desvios Regres.(5)		4,3204	-----
Erro	72	0,01385	-----

- A1 - Frutos curados a 20-25°C sem injúria.
 A2 - Frutos curados a 20-25°C com injúria.
 A3 - Frutos curados a 30°C sem injúria.
 A4 - Frutos curados a 30°C com injúria.

QUADRO 3 - Análise de variância para percentagem de perda de peso de frutos de Laranjas 'Valencia' injuriadas ou não e curadas por diferentes tempos, seguidas de armazenamento à 20-25°C e 90% U.R.

CAUSAS DE VARIACAO	GL	QM	N.S.
Dias	5	443,4428	0,0000%
Tratamento	7	20,1039	0,0000%
D x T	35	1,7137	70,9458%
Erro	96	----	----
TOTAL	143	----	----

TABELA 1 Percentagem média de frutos não infectados de laranja 'Valencia' após cura de ferimento sob diferentes condições, inoculação com *P. digitatum* e armazenamento sob temperatura ambiente (T. 20-25°C, U.R. 85-92%).

Tempo de cura (h)		ARMAZENAMENTO DIAS :					
		1	5	9	13	17	21
(Controle)	A	100a	89,14a	22,22a	11,11a	11,11a	11,11a
24	A	100a	100b	58,34b	36,11b	27,77b	22,22b
	B	100a	100b	69,45c	47,22c	27,77b	16,67ab
48	A	100a	100b	100d	83,34d	66,67c	52,78de
	B	100a	100b	94,44	83,34d	61,12c	44,42cd
72	A	100a	100b	97,22d	91,67d	77,78d	61,12e
	B	100a	100b	94,44d	83,34d	61,12c	58,34e

‡ Para cada coluna dados seguidos de mesma letra não possuem diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A = T= 20-25°C - 85-92% UR

B = T= 30°C - 90% UR.

TABELA 2 Percentagem média de perda de peso de laranja 'Valencia' após cura de fermento a 30°C UR = 90% e armazenamento sob temperatura ambiente (T. 20-25°C, U.R. 85-92%).

Tempo de cura (h)		DIAS DE ARMAZENAMENTO					
		1	5	9	13	17	21
(Controle)	A	0,98	3,91	6,63	9,07	11,47	13,76
	B	0,93	4,05	6,50	8,80	11,05	13,14
24	A	0,33	3,08	5,40	7,24	9,04	11,08
	B	0,36	2,66	4,44	6,36	8,25	10,05
48	A	0,26	3,05	5,54	8,03	10,42	12,74
	B	0,12	2,63	4,59	6,56	8,46	10,32
72	A	0,73	3,95	7,05	10,13	13,02	16,18
	B	0,32	2,46	4,49	6,45	8,47	10,70

A = Frutos injuriados

B = Frutos sem injúria

x = médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.