

**RESISTÊNCIA PÓS-COLHEITA DO PÊSSEGO**  
*(Prunus persica (L) Batsch cv. Biuti) A Monilinia fructicola:*  
**INDUÇÃO DE RESPOSTAS BIOQUÍMICAS**  
**PELA APLICAÇÃO DO CaCl<sub>2</sub> NO LOCAL DA INJÚRIA**

**ANDRÉA LACERDA BITENCOURT DE SOUZA**



Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da  
Biblioteca Central da UFLA

Souza, Andréa Lacerda Bitencourt .

Resistência pós-colheita do pêsego (*Prunus persica* (L) Batsch cv.  
Biuti) a *Monilinia fructicola*: indução de respostas bioquímicas  
pela aplicação de  $\text{CaCl}_2$  no local da injúria / Andréa Lacerda  
Bitencourt de Souza. - Lavras : UFLA, 1998.

161 p. : il.

Orientador: Maria Isabel Fernandes Chitarra

Tese (Doutorado) - UFLA

Bibliografia.

1. Pêssego. 2. Pós-colheita. 3. Resistência. 4. Cura. 5.  
*Monilinia fructicola*. 6. Cálcio. I. Universidade Federal de Lavras.  
II. Título.

CDD - 664.80425  
- 634.256

43031

17/11/2019

**ANDRÉA LACERDA BITENCOURT DE SOUZA**

**RESISTÊNCIA PÓS-COLHEITA DO PÊSSEGO**  
**(*Prunus persica* (L) Batsch cv. Biuti) A *Monilinia fructicola*:**  
**INDUÇÃO DE RESPOSTAS BIOQUÍMICAS**  
**PELA APLICAÇÃO DO  $\text{CaCl}_2$  NO LOCAL DA INJÚRIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora  
Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Isabel Fernandes Chitarra

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1998

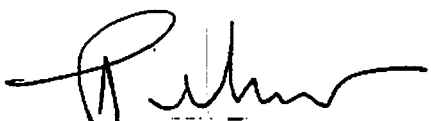
**ANDRÉA LACERDA BITENCOURT DE SOUZA**

**RESISTÊNCIA PÓS-COLHEITA DO PÊSSEGO**  
**(*Prunus persica* (L) Batsch cv. Biuti) A *Monilinia fructicola*:**  
**INDUÇÃO DE RESPOSTAS BIOQUÍMICAS**  
**PELA APLICAÇÃO DO  $\text{CaCl}_2$  NO LOCAL DA INJÚRIA**

**Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".**

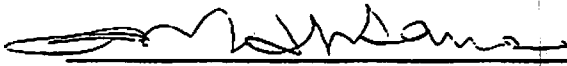
**APROVADA EM 30/03/98**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Adimilson Bosco Chitarra  
(co-orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José da Cruz Machado

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Donizeti Alves

  
\_\_\_\_\_  
Profª Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

  
\_\_\_\_\_  
Profª Dra. Maria Isabel Fernandes Chitarra  
(orientadora)

**A DEUS, MEU SENHOR**

**Ao meu marido Etel**

**Aos meus pais Pedro e Ivone**

**À minha irmã Cláudia**

**À minha tia Célia**

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS meu amado PAI, por me conceder o privilégio de conhecer, com detalhes, parte da sua maravilhosa criação. Por ser, acima de tudo, um grande Amigo, estando sempre ao meu lado me concendo força e esperança. "Senhor eu te louvo pelo seu grande amor para comigo".

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro através da bolsa de estudo e da taxa de bancada, respectivamente.

À professora Maria Isabel Fernandes Chitarra pela valiosa orientação e cuidadosa revisão crítica no texto original, sendo para mim um exemplo de profissional.

Aos professores Adimilson Bosco Chitarra, José da Cruz Machado, José Donizeti Alves e Maria Beatriz Abreu Glória, pela disponibilidade em participar do comitê de orientação e pelas sugestões propostas, as quais enriqueceram ainda mais o nosso trabalho.

Ao professor Augusto Ramalho pela valiosa colaboração na parte estatística.

À professora Vania Déa Carvalho pela amizade e pelos incentivos nos momentos difíceis.

Ao meu querido e amado marido Etel, pelo amor, carinho e compreensão e por estar sempre ao meu lado, compartilhando tanto das alegrias quanto das lutas.

Aos meus pais Pedro e Ivone, por serem para mim exemplos de pessoas e por compartilharem comigo cada momento de minha vida me apoiando e incentivando.

Aos meus irmãos Cláudia e Bruno e cunhados Renato e Eliane pela grande ajuda durante o período experimental e a D.Ronilda pelo incentivo constante.

À minha tia Célia pelo carinho e amizade.

Aos queridos Giselda de Souza, Rogério Amaro, Juliana Audi, Luciana Lima, Jorge Eduardo, Josane Rezende, Sônia dos Santos e Eugênio Portela pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

Ao querido André Faria pela disponibilidade de ajudar e pelo exemplo de entusiasmo constante.

Às colegas de república Rita, Cláudia, Heloísa, Silvana, Dayse e Andréa pela convivência sadia.

À querida D. Saide (*in memorian*), pela amizade e carinho durante todo o curso.

Aos colegas Urquiza, Ana Helena, Silvana, Rosemary, Luiz Carlos, Eduardo, Celeste, Sérgio, Helenice, Regina, Josivan, Neide, Vanderléia (*in memorian*), Josane, Eduardo, Rosimeire, Ricardo, Marcelo, Kelly, Heloísa, Fábio e aos funcionários Cipriano, Miguel, Ivone, Rosa, Maria Aparecida, Andréa e Alzira pelo convívio enriquecedor durante a longa jornada.

Às laboratoristas Magna, Tina, Sandra, Mércia Ana e Eloisa pela disponibilidade em colaborar e atenção dispensada.

Aos funcionários da biblioteca pela convivência gostosa durante todos estes anos.

Ao Sr. Augusto Bertozzi e esposa pelo atenção dispensada durante a colheita dos frutos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Aspectos gerais do pêsego.....	4
2.2 Predisposição dos frutos a doenças pós-colheita.....	6
2.3 Caracterização da <i>Monilinia fructicola</i> e controle de seu desenvolvimento na pós-colheita.....	8
2.4 Estabelecimento de infecção em frutos.....	10
2.5 Aspectos gerais associados a defesa das plantas .....	12
2.5.1 Respostas físicas.....	19
2.5.2 Respostas químicas.....	27
2.5.2.1 Fenilalanina amônia-liase (FAL).....	27

	<b>Página</b>
2.5.2.2 Peroxidase (POD).....	30
2.5.2.3 Polifenoloxidase (PFO).....	36
2.6 Parede celular .....	39
2.6.1 Constituição.....	39
2.6.3 Modificações da parede celular por ocasião da maturação dos frutos e ataque fúngico.....	42
2.7 Papel do cálcio nos processos de cura de ferimentos causados por injúrias mecânicas e agentes patogênicos .....	45
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
3.1 Procedência, coleta e seleção das amostras dos frutos.....	54
3.2 Técnica de injúria mecânica.....	54
3.3 Obtenção e preparo do inóculo de <i>Monilinia fruticola</i> .....	54
3.4 Cura de ferimento e armazenamento dos frutos.....	55
3.5 Obtenção dos discos de tecido dos pêssegos.....	56
3.6 Aplicação e descrição dos tratamentos.....	56
3.7 Instalação dos ensaios.....	58
3.7.1 Ensaio 1: Caracterização dos frutos e perda de massa (umidade) por injúria mecânica, no armazenamento.....	58
3.7.2 Ensaio 2: Efeito do CaCl <sub>2</sub> na elicitação de respostas à cura de ferimentos.....	59
3.7.3 Ensaio 3: Efeito do CaCl <sub>2</sub> na elicitação e respostas de resistência à <i>Monilinia fruticola</i> .....	59
3.7.4 Ensaio 4: Resistência dos tecidos ao desenvolvimento de lesões pela <i>Monilinia fruticola</i> .....	60
3.8 Avaliações físicas.....	61
3.8.1 Massa.....	61
3.8.2 Relação Polpa/Caroço:.....	61

3.8.3 Massa específica.....	61
3.8.4 Diâmetro longitudinal e transversal.....	61
3.8.5 Textura.....	61
3.8.6 Aspecto visual.....	61
3.8.7 Perda de massa.....	61
3.9 Avaliações físico-químicas e químicas.....	62
3.9.1 pH.....	62
3.9.2 Acidez Total Titulável.....	62
3.9.3 Sólidos Solúveis (SS).....	62
3.9.4 Relação Sólidos Solúveis : Acidez Total Titulável.....	62
3.10 Atividade enzimática.....	62
3.10.1 Atividade da Fenilalanina amônia-liase (FAL).....	62
3.10.2 Atividade da Polifenoloxidase (PFO) e Peroxidase (POD).....	63
3.11 Análise da parede celular.....	63
3.11.1 Extração da parede celular.....	63
3.11.2 Açúcares neutros totais não celulósicos, teor de cálcio, grau de esterificação de pectinas e teor de lignina de parede celular.....	64
3.12 Avaliação da resistência dos tecidos a <i>Monilinia fructicola</i> .....	66
3.12.1 Área lesionada.....	66
3.9.2 Avaliação do índice de doença (ID).....	68
3.14 Delineamento experimental e análise estatística.....	69
<b>4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
4.1 Caracterização dos frutos e perda de massa (umidade), por injúria mecânica, no armazenamento.....	69
4.1.1 Avaliações físicas.....	69

	<b>Página</b>
4.1.1.2 Perda de massa (umidade dos frutos) (ensaio 1 ).....	73
4.1.2 Avaliações físico-químicas e química.....	75
4.2 Efeito do cloreto de cálcio na elicitação de respostas à cura de ferimento (ensaio 2).....	77
4.2.1 Atividade enzimática.....	77
4.2.1.1 Fenilalanina amônia-liase (FAL).....	77
4.2.1.2 Polifenoloxidase (PFO).....	80
4.2.1.3 Peroxidase (POD).....	83
4.2.2 Análise de parede celular.....	85
4.2.2.1 Composição em açúcares neutros não celulósicos .....	85
4.2.2.2 Açúcares neutros totais não celulósicos.....	90
4.2.2.3 Cálcio ligado à parede celular.....	92
4.2.2.4 Grau de esterificação das pectinas de parede celular (GE).....	94
4.2.2.5 Lignina associada à parede celular.....	98
4.3 Efeito do cloreto de cálcio na elicitação de respostas de resistência a <i>Monilinia fructicola</i> (ensaio 3).....	100
4.3.1 Atividade enzimática.....	100
4.3.1.1 Fenilalanina amônia-liase (FAL).....	100
4.3.1.2 Polifenoloxidase (PFO).....	102
4.3.1.3 Peroxidase (POD).....	104
4.3.2 Análise de parede celular (ensaio 3).....	106
4.3.2.1 Açúcares neutros totais não celulósicos de parede celular.....	106
4.3.2.2 Cálcio ligado à parede celular.....	109
4.3.2.3 Grau de esterificação de pectina de parede celular (GE).....	111
4.3.2.4 Lignina associada à parede celular.....	112
4.4 Grau de resistência dos tecidos ao desenvolvimento de lesões pela <i>Monilinia fructicola</i> .....	115

	<b>Página</b>
4.4.1 Área lesionada pela podridão parda e índice de doença.....	115
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>120</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>122</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>124</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>153</b>

## RESUMO

**SOUZA, Andréa Lacerda Bitencourt de. Resistência pós-colheita de pêssegos (*Prunus persica* (L.) Batsch cv. Biuti) a *Monilinia fructicola*: indução de respostas bioquímicas pela aplicação do  $\text{CaCl}_2$  no local da injúria. Lavras: UFLA, 1998. 161 p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).**

Foram analisados pêssegos (*Prunus persica* (L.) Batsch cv Biuti), provenientes de Santa Rita de Caldas, sul de Minas Gerais, colhidos no estágio de maturação fisiológica, submetidos a quatro ensaios, a fim de caracterizar os frutos, avaliar o efeito do cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) na elicitação de respostas de cura à ferimento, assim como na resistência dos tecidos a *Monilinia fructicola* através de análises enzimáticas fenilalanina amônia-liase (FAL), polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) e de parede celular (açúcares neutros totais não celulósicos: quantificação e composição, cálcio ligado, grau de esterificação das pectinas (GE) e lignina associada), bem como através da quantificação da área lesionada e do índice de doença. Os frutos, após a colheita, foram selecionados considerando-se a ausência de injúrias visuais e infecções, bem como uniformidade de tamanho e cor, sendo então desinfestados com hipoclorito de sódio a 0,5% por 3 minutos, e secos em temperatura ambiente. De acordo com o ensaio, os frutos receberam os seguintes tratamentos: SF (frutos sem ferimento), FA e FC (frutos feridos mecanicamente e tratados com água e cálcio, respectivamente), ou FAI e FCI (frutos feridos mecanicamente, tratados com água

---

\* Comitê Orientador: Maria Isabel Fernandes Chitarra. Membros da Banca: Admilson Bosco Chitarra, José da Cruz Machado, José Donizeti Alves, Maria Beatriz Abreu Glória

e cálcio, respectivamente, curados por 48 horas e inoculados com conídeos de *Monilinia fructicola*). Os resultados evidenciaram que, tanto o ferimento mecânico quanto a inoculação de *Monilinia fructicola*, induziram o aumento das enzimas (FAL, PFO e POD), sendo que, a aplicação do cálcio retardou o pico de atividade, assim como os níveis das enzimas. Na parede celular verificou-se que o ferimento induziu a síntese de lignina, independentemente da aplicação de água ou cálcio. O cálcio aplicado, foi incorporado à parede das células dos frutos, sendo que a aplicação do íon provocou um aumento no teor de açúcares neutros e redução no grau de esterificação das pectinas da parede celular. Em frutos inoculados, o cálcio reduziu a área lesada pela podridão parda em 34,33%, e o índice de doença dos pêssegos, em 29%, quando comparados aos frutos tratados com água.

## ABSTRACT

### POST-HARVEST RESISTENCE OF PEACH (*Prunus persica* (L) Batsch cv. Biuti) TO *Monilinia fructicola*: INDUCTION OF BIOCHEMICAL RESPONSES BY THE APPLICATION OF $\text{CaCl}_2$ IN THE SITE OF THE INJURY

Peaches (*Prunus persica* (L) Batsch cv Biuti), obtained from Santa Rita de Caldas, Southern region of the State of Minas Gerais (Brazil), were harvested at the physiological maturation state. After they were submitted to four trials in order to characterize the fruit, evaluate the effect of sodium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) in eliciting healing response to wounding, as well as resistance to *Monilinia fructicola* through: enzymes analyses (phenylalanine ammonia-lyase - FAL, polyphenoloxidase - PFO e peroxidase - POD), cell wall (total neutral noncelulose sugar: quantification and composition, bound calcium, stericification degree of pectins (GE) and associated lignin) as well as through the quantification of the injured area and disease index. The fruits were selected by taking into account the absence of visual infections due to injuries as well as uniformity of both size and color, being then disinfected with 0.5% sodium hypochloride for three minutes and dried at room temperature. According to the trial, the fruits were given the following treatments: SF (fruit with no wound), FA and FC

---

\* Guidance Committee: Maria Isabel Fernandes Chitarra. Members of the board: Adimilson Bosco Chitarra, José da Cruz Machado, José Donizeti Alves, Maria Beatriz Abreu Glória

(mechanically wounded and treated with water and calcium, respectively) or FAI and FCI (mechanically wounded and treated with water and calcium, cured for 48 hours and inoculated with *Monilinia fructicola* spores). The results indicated that both the mechanical wound and *Monilinia fructicola* inoculation induced the increase of enzymes (FAL, PFO and POD), and that the application of calcium delayed the peak of activity as well as the levels of enzymes. At the level of cell wall, it was found that the wound induced lignin synthesis, regardless the application of either water or calcium. The calcium applied was incorporated into the cell wall of fruits, and the application of the ion caused and increased neutral sugar content and reduced sterification degree of pectins of the cell wall. In inoculated fruit, calcium reduced the injured area of brown rotting by 34.33% and the disease index of peaches by 29% as compared with the water treated fruits treated with water.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de pêssego, no Brasil, mesmo tendo sido implantada há muito tempo, não tem apresentado expressão compatível com a sua potencialidade. Com a abertura comercial, o produto de melhor aparência que abastece o consumo nacional provém de outros países, notadamente do Cone Sul, como é o caso do Chile (Maia, Amaro, Golçalves e Souza, 1996).

Em decorrência da formação dos grandes blocos econômicos (CE, NAFTA, Mercosul, etc), o mercado tem se tornado cada vez mais competitivo, aumentando, conseqüentemente, o nível de exigência de demanda de produtos de alta qualidade.

Entretanto, a falta de cuidados específicos durante a colheita, o transporte e o armazenamento, acarretam uma série de danos aos frutos, prejudicando sua qualidade.

Injúrias superficiais, muitas vezes imperceptíveis, ocorridas logo após a colheita, desenvolvem cicatrizes como resultado da perda de umidade no local do

ferimento, reduzindo a qualidade dos frutos, podendo torná-los inaceitáveis no mercado. A ocorrência de injúrias pode também expor os frutos a diversas podridões pós-colheita.

No Brasil, há carência de utilização de tecnologia de ponta no manuseio desses produtos perecíveis, acarretando imensos prejuízos que se agravam uma vez que predisõem o mercado externo contra o produto nacional.

Desta forma, informações precisas acerca das respostas de plantas a ferimentos são essenciais para o entendimento dos processos que facilitem ou interfiram no desenvolvimento de infecções, uma vez que, muitas doenças sérias são induzidas por patógenos que penetram através dos ferimentos.

Torna-se necessário, portanto, o estudo dos mecanismos envolvidos no processo de cura de ferimentos e resistência dos tecidos vegetais a doenças, para que se faça um controle efetivo de várias doenças pós-colheita. Através deste conhecimento, poderão ser desenvolvidas técnicas específicas, visando a diminuição das perdas, melhoria da qualidade, queda nos custos de produção e aumento da disponibilidade de frutos comercializáveis.

Dando continuidade aos trabalhos já desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica de Frutos da Universidade Federal de Lavras, dentro da linha de pesquisa que abrange os mecanismos de resistência ao ataque de patógenos através do processo de cura de ferimento, na fase pós-colheita de frutos, o presente estudo apresenta os objetivos discriminados a seguir:

\* Conhecer as respostas relacionadas à cura de ferimento e à resistência dos tecidos em pêssogo à ação de microrganismos patogênicos;

\* Verificar, através de estudos enzimáticos, os mecanismos de defesa dos frutos injuriados mecanicamente, inoculados ou não com esporos de *Monilinia fructicola*, na presença e ausência de cálcio;

**\* Observar o efeito da aplicação de cálcio em tecidos injuriados, sobre o desenvolvimento de resistência ao ataque fúngico;**

**\* Verificar, ao nível de parede celular, as respostas apresentadas pelos tecidos injuriados, quando tratados com cálcio.**

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais do pêssego

O pessegueiro (*Prunus persica* (L) Batsch cv. Biuti pertence à família Rosaceae e foi introduzido no Brasil através de mudas provenientes de Portugal (Pimentel, 1975).

A cultivar Biuti, é caracterizada por apresentar frutos de tamanho grande com cavidade peduncular média, sutura rasa, epicarpo suave de coloração vermelha em fundo amarelado, com pouca pilosidade. O mesocarpo é amarelo, firme, com sabor e aroma agradáveis. Apresenta auréola avermelhada em torno do endocarpo e caroço que é preso e de tamanho médio. O fruto é recomendado tanto para mesa quanto para a indústria (Alvarenga e Fortes, 1985).

Do ponto de vista fisiológico, o fruto pode ser definido como sendo uma estrutura resultante do desenvolvimento do tecido que suporta o óvulo da planta, sendo sua vida iniciada com a fertilização. Ocorrem, a seguir, as fases de

crescimento, maturidade, amadurecimento e senescência (Melford e Prakash, 1986).

Durante a maturação de pêssegos, frutos climatéricos, ocorrem mudanças na composição química, decrescendo a coloração verde com o aparecimento da cor amarela ou laranja tanto na casca como na polpa (Rood, 1972).

O processo de amadurecimento típico é dividido em dois estádios. No primeiro, o amaciamento dos tecidos ocorre lentamente, ao passo que no segundo, a perda da firmeza é rápida e está associada a um aumento marcante na atividade da poligalacturonase (PG) (Orr e Brady, 1993).

O amaciamento dos frutos é decorrente da conversão da protopectina a formas solúveis (Chapman e Horvat, 1990). Pressey, Hinton e Avants (1971) reportaram a existência de uma correlação positiva entre a atividade da poligalacturonase (PG) e o aumento da pectina solúvel em água, não sendo observado o mesmo quanto à atividade da pectinametilesterase (PME). Estudando-se, todavia, a celulase, pôde-se evidenciar aumento da atividade da enzima durante o amolecimento de pêssegos sugerindo uma atuação conjunta com as enzimas pécticas PG e PME, durante o amadurecimento (Hinton e Pressey, 1974).

O sabor dos pêssegos se relaciona com o balanço doçura/acidez. Foi evidenciada a presença dos ácidos succínico, málico e cítrico, com predominância dos dois últimos na colheita. A acidez se reduz com a maturação, com conseqüente aumento nos valores de pH. O conteúdo de açúcares totais dos frutos apresenta consideráveis mudanças durante o amadurecimento. A sacarose predomina sobre os açúcares redutores (glicose + frutose), ocorrendo o aumento máximo nas últimas semanas de maturação (Chitarra e Carvalho, 1985).

No Brasil, as principais regiões produtoras de pêssego, cuja exploração visa a comercialização, concentram-se nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais, onde são encontradas as melhores condições edafoclimáticas. A área plantada, no território brasileiro, é da ordem de 20 mil hectares, sendo que 75% deste total se encontra no Rio Grande do Sul, destacando-se a seguir São Paulo e Santa Catarina com um total de 15% da área plantada. A produção anual brasileira é superior a 100 mil toneladas, sendo 57% destinada ao consumo “in natura” e 43% a industrialização (Brasil, 1994).

Em Minas Gerais, a colheita da cultivar Biuti, é iniciada na primeira quinzena de novembro. A época ideal para a colheita é fator indispensável para a obtenção de frutos com características de qualidade, sendo dependente da distância do mercado a que se destinam os frutos, do meio de transporte a ser utilizado, do intervalo entre a colheita e o consumo ou a industrialização (Bleinroth, 1969).

## 2.2 Predisposição dos frutos a doenças pós-colheita

Os ferimentos ocorridos durante a colheita e o manuseio na comercialização, predispõem os frutos a doenças pós-colheita (Rushing, 1995). Segundo Biggs (1984 e 1988), todas as cultivares comerciais de pêssego são susceptíveis a patógenos.

Propágulos de bactérias e fungos infectantes são freqüentemente abundantes nas superfícies de frutos e hortaliças, e sua germinação é estimulada quando ocorrem injúrias que expõem nutrientes e umidade, essenciais ao desenvolvimento dos patógenos. Muitos patógenos, como a *Monilinia fructicola*,

por exemplo, só penetram nos tecidos vegetais através de injúrias tais como perfurações, cortes, abrasões e amassamentos, comuns durante a colheita e manuseio dos produtos, levando-os a deterioração (Filho e Amorim, 1996).

Após injúrias mecânicas, fisiológicas ou mesmo aquelas causadas por patógenos durante a colheita, manuseio e armazenamento, muitos frutos apresentam rápidas mudanças na coloração, com escurecimento dos tecidos, o que prejudica a aparência na comercialização "in natura", assim como no processamento. A extensão da descoloração depende não apenas da severidade da lesão mas, também, do escurecimento potencial inerente ao fruto, decorrente do conteúdo endógeno de compostos fenólicos e dos níveis de atividade das enzimas oxidantes. Desta forma, a coloração natural dos frutos, pode ser modificada ou mascarada pela formação de pigmentos marrons ou avermelhados, tornando-os rejeitados pelo consumidor (Kader e Chordas, 1984).

A susceptibilidade dos frutos e hortaliças injuriados a infecção por vários patógenos pós-colheita é alterada pela acumulação de compostos tóxicos nos sítios de infecção, assim como pela cura de injúrias através da suberização ou lignificação (Filho e Amorim, 1996).

Dentre as doenças pós-colheita, é possível estabelecer dois grupos: aqueles que aparecem no campo durante a condução da cultura, e aquelas que são próprias do período posterior a colheita (Vigliola e Calot, 1986). De acordo com Brown (1989) e Eckert e Ratnayake (1993), no primeiro grupo encontra-se a podridão parda causada pelo fungo *Monilinia fructicola* G. Went, que é facilmente controlada, uma vez que o controle das práticas culturais e fitossanitárias são conhecidas.

A podridão parda é considerada a mais importante doença do pessegueiro no Sul do País e, em anos úmidos, pode acarretar perdas significativas. Acomete diversas espécies de frutícolas como pêssegos, cerejas,

ameixas, abricó e amêndoas com igual severidade (Agrios, 1996). Para que ocorra a infecção, há necessidade de temperatura e umidade elevadas, o que normalmente ocorre na primavera (Fortes, 1989).

As perdas dos frutos acometidos por podridão parda, resultam primariamente do apodrecimento dos mesmos no pomar e, posteriormente, podem ocorrer sérias perdas durante o transporte e a comercialização. Em infecções severas e na ausência de um bom controle, cerca de 50 a 75% dos frutos podem apodrecer no pomar, e o restante pode ser infectado antes de alcançar o mercado consumidor (Agrios, 1996).

Além da *Monilinia fructicola* existem aproximadamente 25 espécies de fungos e bactérias que são responsáveis pelas maiores perdas de produtos vegetais durante a pós-colheita (Eckert e Ratnayake, 1993).

### **2.3 Caracterização da *Monilinia fructicola* e controle de seu desenvolvimento na pós-colheita**

*Monilinia fructicola* pertence ao filo Ascomycotina, ordem Helotiales; família Sclerotiniaceae. As espécies do gênero *Monilinia* são caracterizadas por não possuírem esclerócios típicos. Os apotécios são formados em uma massa estromática produzida no tecido afetado, geralmente em frutos mumificados. A fase anamórfica produz conídios em cadeias (Agrios, 1996).

Os pêssegos jovens são mais resistentes à infecção, porém, a resistência diminui com a evolução da maturação, sendo então invadidos através de injúrias causadas por insetos ou outros agentes. Inicialmente os frutos apresentam manchas marrons, encharcadas, resultantes do crescimento do micélio, e as

enzimas secretadas pelo patógeno dissolvem a lamela média das células do hospedeiro. O fruto torna-se seco e mumificado, podendo permanecer preso à planta ou cair ao solo. Os frutos mumificados que ficam presos na planta, constituem fonte de infecção, e aqueles que caem no solo produzem os apotécios do fungo (Agrios, 1996).

Após a colheita, as perdas por infecção, ocorrem durante o armazenamento, o amadurecimento e a comercialização dos frutos frescos. Mesmo nos frutos selecionados, que aparentemente estão livres da podridão na colheita, podem estar presentes os esporos de *Monilinia fructicola* em número suficiente para criar problemas posteriores (Coelho, 1994).

O controle da doença é feito através de medidas profiláticas e erradicativas. Os dois primeiros métodos são mais viáveis e eficientes na redução de riscos com a perda de produção (Fortes, 1989).

Na pós-colheita, podem-se utilizar tratamentos aplicados através da imersão dos frutos em coberturas protetoras como ceras, filmes plásticos, fungicidas, intermitência de temperatura, e a combinação entre estes tratamentos (Coelho, 1994). A utilização de cloreto de cálcio tem sido também empregada com sucesso na redução de patologias de frutos (Holland, 1993).

O controle químico é tradicionalmente feito com benomil, apresentando-se eficiente no controle da doença. Entretanto, devido ao uso constante e muitas vezes exclusivo do fungicida, tem sido observado a indução de tolerância ao princípio ativo (Fortes, 1987), a exemplo do que já foi relatado em outros países (Ogawa e Gilpatrick, 1977).

Trabalhos têm evidenciado eficiência dos princípios ativos flusilazol 0,01%; vinclozoline 0,0075%; triforine 0,005% e isoprodone 0,0075% no controle de cepas de *Monilinia fructicola* tolerantes ao Benomil (Fortes, 1987; Balardin, Balardin e Chaves, 1994).

O uso de iprodione (Rovral) apresenta vantagens sobre os benzimidazóis na pós-colheita, principalmente pelo fato de não induzir a resistência, quando usado criteriosamente (Berton; Schroeder e Bleicher, 1992)

## **2.4 Estabelecimento de infecção em frutos**

Quando o patógeno se confronta com a parede celular vegetal, este enfrenta uma barreira complexa, composta por polímeros associados através de diferentes ligações químicas, que requerem enzimas específicas para sua degradação (Bateman e Basham, 1976).

Um aspecto característico de muitos organismos patogênicos, é sua habilidade em produzir uma série de enzimas, capazes de degradar os polissacarídeos complexos da parede celular de plantas. Em muitas infecções causadas por agentes microbianos, a permeabilidade da parede celular é alterada, levando à penetração do patógeno e posterior colonização dos tecidos vegetais (Bateman e Basham, 1976).

As enzimas pécticas, responsáveis pela degradação da parede celular, são produzidas por esporos de patógenos, quando em germinação (Barash, 1968), sendo a alteração ou degradação dos componentes estruturais de parede das células hospedeiras durante a patogênese, um aspecto característico das plantas doentes (Bateman e Basham, 1976).

Uma infecção bem sucedida, causada por microrganismos patogênicos, requer uma superfície de fixação, degradação das barreiras químicas e físicas, a produção de toxinas e a inativação das defesas das plantas (Lamb et al., 1989).

A germinação de esporos é, necessariamente, acompanhada pela biossíntese de ácidos nucléicos, proteínas, sistemas de membranas e paredes celulares (Ryan, 1983).

Estudos realizados em tecidos foliares evidenciaram que o crescimento de uma hifa fúngica ocorreria entre a epiderme e o mesofilo de tecidos foliares (Ryan, 1983).

Segundo Mayer (1989), alguns patógenos podem ser tão bem adaptados a seus hospedeiros que eles crescem, biotroficamente, através do tecido vegetal entre a membrana plasmática e a parede celular, ou mesmo dentro dos espaços intercelulares, sem causar danos aparentes as células do hospedeiro e sem desencadear respostas de defesa.

Um aspecto característico que muitas doenças pós-colheita têm em comum é que, em muitos estádios, entre a inoculação do patógeno e o desenvolvimento de doenças do hospedeiro, o crescimento do mesmo é impedido. O período latente de colonização pelo patógeno varia e tem sido atribuído à presença de compostos tóxicos, assim como à ausência de determinadas substâncias essenciais ao mesmo, ao potencial inadequado das enzimas para colonização e/ou à produção de fitoalexinas após a infecção. Compostos inibitórios, especialmente fenólicos, seus derivados, e fitoalexinas, que são componentes fungitóxicos pré-formados, estão altamente associados com a resistência dos tecidos de plantas a degradação microbiana (Swineburne, 1983).

A resistência em muitas doenças, envolve, provavelmente, um sistema de defesa múltiplo coordenado, agindo em vários pontos durante a invasão e colonização. Um único gene pode regular, aparentemente, mais do que um mecanismo de resistência. Por exemplo, o gene R de batata (Ride, 1978) e o gene MI-a de cevada têm sido associados com vários mecanismos de defesa.

Clarke (1972); Johnson, Bushnell e Zeyen (1979), citados por Vance, Kirke e Sherwood (1980), observaram que em tecidos resistentes, o processo de lignificação ativou diferentes vias fenólicas, quando comparados à tecidos susceptíveis.

## **2.5 Aspectos gerais associados a defesa das plantas**

As plantas são dotadas de uma variedade de mecanismos de defesa que as protegem quando os tecidos são lesados (Ouchi, 1991). Uma das razões primárias, para o estudo das respostas das plantas aos ferimentos é a necessidade do esclarecimento dos processos envolvidos, dando subsídio a ações que venham minimizar as infecções, assim como a perda de fluido depois da injúria (Akai, 1980).

Os órgãos vegetais são normalmente protegidos da dissecação, e em maior extensão, da infecção por patógenos, devido a presença de substâncias, tais como cutina, suberina e lignina. Quando ocorrem injúrias, as células expostas ao ambiente podem se tornar dissecadas e ou infectadas, a menos que a impermeabilidade seja rapidamente restabelecida.

As respostas aos ferimentos podem diferir entre os órgãos de uma mesma espécie de planta ou entre espécies distintas. A proliferação de células é comum em muitas plantas herbáceas e dicotiledôneas lenhosas, sendo que, em muitas monocotiledôneas, a primeira camada de células intactas, adjacentes à injúria, é modificada pela acumulação de várias substâncias anti-microbianas e de substâncias impermeáveis a água, incluindo a suberina e a lignina (Moon, Peterson e Peterson, 1984; Rittinger, Biggs e Peirson, 1987).

De acordo com Baudoin e Eckert (1985), a água disponível nos tecidos poderia atuar removendo ou diluindo os inibidores das enzimas de maceração ou substâncias químicas fungitóxicas, dificultando, desta forma, o processo infeccioso. Foi evidenciado que as zonas lignificadas eram menos resistentes a degradação da parede celular quando a água livre estava presente nos espaços intercelulares.

Segundo Schmelzer et al. (1995), as reações de defesa podem ser induzidas em três diferentes níveis: dentro de células imediatamente afetadas pela invasão fúngica, dentro de uma região limitada de tecido ao redor do sítio de penetração fúngica, e dentro do órgão ou da planta (reação sistêmica). Enquanto a morte de células é usualmente restrita àquelas diretamente penetradas pelo fungo, várias mudanças metabólicas ocorrem na vizinhança do sítio de penetração e/ou dentro de todo o órgão ou da planta, sem que ocorra alteração visível da morfologia celular. A ativação de funções metabólicas pelas células danificadas ocorre de forma abrupta, com aumento da taxa de respiração e colapso rápido do protoplasma.

Quando uma planta é atacada por um patógeno potencial, há a elicitação de respostas complexas de defesa, com ativação de vários genes, resultando na síntese e na acumulação de metabólitos secundários (fitoalexinas e fenólicos), macromoléculas estruturais (calose, lignina e glicoproteína rica em hidroxiprolina) e de uma variedade de proteínas (proteínas relacionadas com a patogênese, inibidores de enzimas, enzimas hidrolíticas e enzimas do metabolismo secundário). Desta forma, a infecção da planta pelo patógeno é acompanhada por mudanças metabólicas consideráveis (Bell, 1981; Carry e Klessig, 1989; Benhamou, Grenier e Chrispeels, 1991).

Segundo Bernards e Ellis (1991), dois tipos de compostos fenólicos são evidenciados após a inoculação fúngica. O primeiro compreende os compostos

esterificados, liberados da parede celular por hidrólise básica leve, evidenciados a partir de análises com HPLC (cromatografia líquida de alta performance). A esterificação de ácidos fenólicos tem sido observada em material de parede celular de células em suspensão de salsa, tratadas com elicitores. A segunda população de fenólicos está também associada à parede celular e compreende material polimérico, não básico, lábil. O material fenólico sintetizado na parede celular pode atuar como uma barreira tanto química quanto física ao patógeno, como proposto por Henry e Jensen (1973).

No que diz respeito à indução das respostas de defesa, esta é desencadeada por sinais, liberados durante o ataque de patógenos. Alguns destes sinais, causam uma resposta rápida na vizinhança do sítio de ataque, a fim de selar o invasor, ou expor o patógeno a substâncias químicas tóxicas. Alguns sinais, podem iniciar respostas em tecidos localizados a muitos centímetros de distância dos sítios de ferimento ou de ataque de patógenos (Reuveni et al., 1992; Johal et al., 1995).

Segundo Gäumann (1950), dois aspectos podem ser considerados: a defesa plasmática, resultante do funcionamento bioquímico das células vivas e as reações de defesa necrogênica, resultante da morte das células no ponto de infecção.

Mansfield (1982) e Matern e Kneusel (1988) propuseram que a estratégia de defesa das plantas ocorre em dois estágios. No primeiro, ocorreria uma rápida acumulação de fenóis nos sítios de infecção, que atuariam para retardar ou paralisar o crescimento do patógeno e permitir a ativação de estratégias secundárias que poderiam restringir o seu desenvolvimento. Respostas secundárias poderiam envolver a ativação de defesas específicas, tais como a síntese “de novo” de fitoalexinas ou de outras substâncias relacionadas. Segundo os autores, as respostas iniciais de defesa deveriam ocorrer rapidamente, e seria improvável

envolverem a transcrição “de novo” e a tradução de genes, que poderiam ser característicos do segundo nível de defesa. Conseqüentemente, a seqüência de eventos na resposta de defesa poderia ser conhecida por incluir necrose e morte da célula, acumulação de fenóis tóxicos e modificação da parede celular por substâncias fenólicas ou barreiras físicas, como a aposição de papilas. Finalmente ocorreria a síntese de antibióticos específicos, tais como as fitoalexinas, estando associadas à transcrição “de novo” e tradução de genes, requerendo mais tempo do que o aparecimento imediato de substâncias escurecidas (Hahlbrock e Scheel, 1989; Dixon e Lamb, 1990).

Segundo Mansfield (1990), a morte da célula resulta em danos irreversíveis da membrana. Indiferentemente das razões que levam à morte da célula, o rápido acúmulo de fenóis isola efetivamente o agente causador da injúria, patógeno ou não, no sítio original de acesso (Ride, 1983). Estas respostas incluiriam a formação da lignina, acumulação de aposições na parede celular como papilas e acumulação precoce de fenóis dentro da parede celular do hospedeiro. Numerosos estudos sugerem que fenóis de baixo peso molecular, tais como o ácido benzóico e os fenilpropanóides são formados como resposta inicial à infecção. Fortes evidências sugerem que a esterificação de fenóis de parede celular seria um fato comum na expressão de resistência (Fry, 1986). Além disto, a acumulação de fenóis polimerizados ocorreria como uma resposta rápida à infecção (Farmer, 1985). Uma resposta comum seria a esterificação de ácido ferrúlico da parede celular do hospedeiro, e tem sido sugerido que as ligações cruzadas de tais ésteres fenilpropanóides levariam à formação de polímeros semelhantes a lignina (Fry, 1986). O ácido hidroxicinâmico e seus derivados são considerados como responsáveis pela descoloração e autofluorescência dos tecidos do hospedeiro, evidenciados freqüentemente nos sítios de infecção (Farmer, 1985).

As reações de escurecimento enzimático em tecidos de plantas foram divididas em dois diferentes grupos referidos como: “escurecimento funcional” e “escurecimento adventício” (Bonner, 1957, citado por Harel, Mayer e Lerner, 1970). O escurecimento funcional ocorre durante o desenvolvimento normal da planta e o escurecimento adventício acompanha a injúria celular, sendo de importância primária no congelamento de pêssegos, uma vez que, este processo é responsável por ativar as enzimas responsáveis pela reação de escurecimento. As enzimas oxidativas, especialmente a peroxidase e a polifenoloxidase, podem causar o escurecimento não apenas durante o armazenamento refrigerado de frutos e hortaliças, mas, também, durante a retirada da refrigeração, ou diante de algum tipo de injúria mecânica ou por patógenos (Harel, Mayer e Lerner, 1970).

A atividade inibitória dos compostos fenólicos varia de acordo com a dosagem, estrutura química e órgão afetado. Mudanças nos níveis dos mesmos, após a inoculação do patógeno, parecem estar associadas com a resistência do tecido (Reid et al., 1992).

Em tomateiros, o metabolismo dos fenilpropanóides desempenha um papel essencial nas respostas ao fungo *Verticillium albo-atrum*. Constatou-se em cultura de células de tomate, inoculadas com *V. albo-atrum*, um aumento no nível de fenólicos da parede celular, cinco vezes superior em relação às culturas controles não inoculadas (Bernards e Ellis, 1991).

Em folhas de milho, a infecção fúngica também estimulou a síntese de compostos fenólicos, com um rápido aumento nos níveis de atividade da enzima ácido 4-hidroxicinâmico ligase (CoA-ligase) (Lyons, Wood e Nicholson, 1990).

A resistência de plantas a infecção por várias espécies de *Fusarium*, é conhecida por ser resultante da ação de compostos fenólicos (Reid et al., 1992).

Em plantas de milho, após infecção com *Colletotrichum graminicola*, Hammerschmidh e Nicholson (1977) observaram que os flavonóides se

acumularam mais rapidamente em linhagens resistentes do que em susceptíveis. Resultados semelhantes foram obtidos em tubérculos de batata (Ampomah e Friend, 1988).

Outros mecanismos possíveis relacionados à resistência a doenças seriam as barreiras estruturais à penetração física, a inibição de enzimas e toxinas dos patógenos e a resistência ao movimento de nutrientes, água, enzimas ou toxinas (Ride, 1978).

Muitas plantas são resistentes a vários fungos parasitas. Esta resistência do hospedeiro pode ser passiva ou ativa (Ride, 1985 citado por Moerschbacher et al., 1990). Em alguns casos, barreiras físicas e químicas pré-formadas evitam, indiferentemente, o desenvolvimento do fungo (Kolattukudy e Koller, 1983).

As respostas metabólicas gerais que associam a resistência natural de plantas e a resistência não induzida são similares, se não, idênticas àquelas associadas com a resistência sistêmica induzida (Pan, Ye e Kué, 1989; Tuzum et al., 1989; Ye, Pan e Kué, 1990).

A susceptibilidade ou a resistência é determinada não pela presença ou ausência de "genes de defesa", mas pela rapidez ou magnitude na qual a informação genética é expressa (Pan, Ye e Kué, 1992).

De acordo com Kurosaki e Nishi (1984), as respostas de defesa das plantas, além de serem reguladas por elicitores endógenos, podem ser reguladas, também, por supressores endógenos (ES), obtidos a partir de plantas sadias. Os elicitores endógenos em cenoura, soja, feijão, tomate e rabanete, induzem a produção de fitoalexinas e/ou proteínas associadas a patogênese, o reforço da parede celular pela deposição de lignina e acumulação de glicoproteína rica em hidroxiprolina, assim como a produção de inibidores de proteinase e enzimas hidrolíticas, tais como quitinases e glucanases (Doherty, Selvendran e Bowles, 1988; Ouchi, 1991).

A iniciação de todas estas respostas requer a percepção de sinais apropriados pelas células das plantas e suas transmissões para sítios específicos de ativação. Os passos individuais, nesta seqüência de eventos, são difíceis de serem estudados em sistemas intactos de plantas/patógeno. Eles incluem processos localizados, assim como processos sistêmicos, que ocorrem em diferentes períodos de tempo após a inoculação (Scheel et al., 1986).

Uma série de sinais podem estar envolvidas nas respostas sistêmicas. A evidência é, primeiramente, baseada tanto na transmissão temporal dos sinais quanto na natureza das respostas. Em folhas de tomate injuriadas, o sinal que induz a síntese de inibidores de proteinase requer cerca de 90 minutos para ser transmitido do ferimento para as células localizadas fora da área ferida (Nelson et al., 1981, citado por Ryan, 1983).

Fragmentos de polissacarídeos ou oligossacarídeos e glucans, os que podem ser formados a partir da deposição da calose, estimulada por injúria mecânica, e podem atuar como elicitores (Keen e Yoshikawa, 1983).

Estes oligossacarídeos são uma pequena cadeia de resíduos de açúcares interconectados por ligações glicosídicas. Alguns oligossacarídeos selecionados (oligossacarinas) podem, em concentrações muito reduzidas, exercer efeitos sinalizadores nos tecidos de plantas (Aldington e Fry, 1993).

Algumas oligossacarinas também têm sido consideradas como elicitores, induzindo respostas que podem atuar na resistência de plantas a doenças, tendo sido evidenciado também, seu efeito no crescimento e no desenvolvimento do patógeno (Fry et al., 1993).

Um componente comum dos sinais transmembrana na defesa dos patógenos de muitas plantas parece ser um aumento na concentração de cálcio (Knight et al., 1991; Renelt et al., 1993). Em células de plantas, assim como em

de animais, os níveis de cálcio citosólico são baixos e controlados com rigidez (Alexandre, Lassalles e Kado, 1990).

Estudos em plantas de feijão e tabaco "in vitro" evidenciaram também que o peróxido de hidrogênio liberado durante as reações oxidativas, estimuladas pela elicitação com um oligogalacturonídeo, atuou como uma barreira à penetração do patógeno, uma vez que se ligou as proteínas solúveis 33 a 100 Kda de parede celular, desempenhando um importante papel contra a infecção microbiana (Bruce e West, 1989; Bradley, Kjellbom e Lamb, 1992; Peng e Kue, 1992; Lange, Lapierre e Sandermann, 1995).

A produção de fitoalexinas, compostos microbianos de baixo peso molecular, sintetizados e acumulados em plantas após a exposição das mesmas a microrganismos, especialmente fungos, é mais um mecanismo de defesa que confere a resistência das plantas às doenças (Paxton, 1981; Albersheim e Valent, 1978).

### 2.5.1 Respostas físicas

A habilidade inerente aos tecidos vegetais de formarem barreiras físicas ao redor de injúrias ou de tecidos injuriados, é considerado como uma expressão de resistência a doenças ou limitação do alastramento do patógeno dentro das plantas. As barreiras incluem papilas, deposição de calose, suberina, silicone, lignina e cálcio (Banko e Helton, 1974; Stockwell e Hanchey, 1985).

Estudos evidenciaram que a deposição de calose, induzida imediatamente após a injúria mecânica em feijão, apresentou um aumento nas primeiras 6 horas,

sendo a seguir reabsorvida lentamente até o nível zero, três dias após o tecido ter sido injuriado mecanicamente (Takahashi e Jaffe, 1984).

A formação de papilas tem sido também observada, sendo efetivas no bloqueio da penetração fúngica, em células hospedeiras (Bell, 1981).

Segundo Aist (1976), muitas correlações existem entre a produção de papila e a resistência a penetração fúngica.

Em gramíneas, a formação de papilas entre a parede celular e a membrana plasmática, assim como a lignificação da superfície externa da parede celular, parece importante para a resistência (Politis, 1976). As papilas são, desta forma, um importante componente de resistência, sendo formadas, provavelmente, por outros materiais além da calose e celulose, (Bell, 1981).

Além das papilas, halos também podem ocorrer. Estes foram evidenciados em folhas e cotilédones de aveia, em resposta a penetração por fungos não patogênicos (Ride e Pearce, 1979).

Portanto, as defesas de plantas contra microrganismos consistem de uma variedade de barreiras pré-formadas e respostas bioquímicas. Numerosos metabólitos secundários tóxicos, usados como barreira química, são sintetizados em concentrações suficientes. Materiais estruturais como a cutícula e a parede celular são barreiras físicas efetivas a invasão. As plantas também produzem uma variedade de polissacarídeos que são secretados para a parede celular e para o meio extracelular em resposta a intrusão do patógeno (Valluri e Soltes, 1990).

A calose tem sido ocasionalmente, observada em tecidos injuriados como resistência do hospedeiro. É formada por  $\beta$ 1-3 glucan, podendo estar associada a outros compostos, tais como: lignina, proteína e fosfolipídeos, sendo resposta ao estresse (Brown, 1989).

Em relação a lignina, esta é um dos mais abundantes biopolímeros de fenol, formada principalmente pela condensação de radicais livres de álcool

hidroxicinamil. É resistente a degradação por muitos microrganismos, sendo conhecida, por ser formada comumente como resposta à penetração microbial e danos mecânicos (Bell, 1981).

O termo lignina é usado para designar um grupo de substâncias com unidades (básicas) semelhantes, cuja estrutura química é muito complexa e ainda não muito bem definida. Butler e Bailey (1973), referiram-se à lignina como um polímero, 3-metoxi-fenil-propenol e 3,5-di-metoxi-fenilpropenol, ligados em proporções variadas e em seqüência casualizada, originando assim, grande variedade de produtos, o que dificultaria a sua exata definição. A maioria dos vegetais superiores contém, pelo menos, alguma fração de lignina, havendo variações no seu conteúdo de 4 a 12%. Em forragens mais fibrosas, sua percentagem pode chegar a 20% da matéria seca, sendo a fração menos digestível desta (Silva, 1981).

Em plantas primitivas, a rota principal que leva a biossíntese de lignina e ao tanino condensado, ocorre a partir da protocianidina. No curso da evolução, a lignina perde sua importância como um produto final e o intermediário ácido hidroxi-cinâmico pode ser usado para outros propósitos. A maior importância da lignina é a proteção contra herbívoros e patógenos e, caracteristicamente, estes derivados do ácido caféico têm sido indicados por apresentarem função de proteção. Sua biossíntese pode ser induzida pelo ataque de fungos ou de herbívoros, de forma similar. A concentração destes compostos pode mudar rapidamente, uma vez que o conteúdo de ácido clorogênico, por exemplo em *Coffea*, apresenta uma taxa de "turnover" de 100% em apenas quatro dias (Molgaard e Helle, 1988).

As enzimas chave na síntese de lignina são fenilalanina amônia-liase (FAL), e tirosina amônia-liase (TAL), responsáveis pela conversão da fenilalanina e tirosina em ácido cinâmico e ácido 4-hidroxicinâmico,

respectivamente; ácido cinâmico 4-hidroxilase (CAH), que converte o ácido cinâmico em ácido hidroxicinâmico; ácido caféico  $\sigma$ -metil transferase que adiciona grupamento metil as hidroxila C-3 e C-5 dos ácidos caféicos e 5-hidroxiferrúlico, respectivamente; e peroxidase (POD), que polimeriza os álcoois hidroxicinamil (Legrand, Fritig e Hirth, 1976).

A peroxidase aniônica, localizada na parede celular, é conhecida por ser responsável pela biossíntese de lignina, baseado na sua afinidade com os álcoois cinamil, (Lagrimini, 1987). A lignificação e suberização de tecidos feridos catalizados por uma peroxidase têm importantes implicações na cura de ferimentos e na resistência a doenças (Espelie, Franceschi e Kolattukudy, 1986).

Os precursores de lignina ou dos intermediários produzidos pela planta, de baixo peso molecular, poderiam atuar como elicitores da síntese de lignina. O álcool coniferil, por exemplo, pode complexar-se com as proteínas ricas em hidroxiprolina e com carboidratos, ao passo que o ácido ferrúlico pode complexar-se com carboidratos (Vance, Kirk e Sherwood, 1980).

A quitina, presente na parede celular de fungos, pode atuar como matriz para a lignificação. Conseqüentemente, é possível que os precursores de lignina reajam com a parede de fungos, e os polímeros de membrana ativem o sistema de reconhecimento ou bloqueiem sua ativação por outros compostos (Vance, Kirk e Sherwood, 1980).

Os precursores de lignina de certos grupos de plantas, podem complexar-se mais prontamente com parede quitinizada de fungos (ascomicetos e basidiomicetos) do que com as paredes não quitinizadas (oomicetos) (Vance, Kirk e Sherwood, 1980).

A lignina forma ligação covalente com a celulose, pectatos e proteínas estruturais, quando sintetizada na presença destes compostos.

Ride (1980) sugeriu que 5 vias para a lignificação poderiam interromper o crescimento do fungo através do tecido da planta: 1. a lignina faria com que a parede celular se tornasse mais resistente à penetração mecânica, uma vez que aumentaria a resistência da parede às forças ocorridas no ponto de penetração do fungo; 2. a lignificação da parede celular no ponto de penetração poderia torná-la resistente a dissolução pelas enzimas fúngicas. Friend (1976) postulou que a esterificação dos polissacarídeos da parede celular com derivados do ácido cinâmico poderia alterar, convenientemente, os polissacarídeos. O ácido ferrúlico e o álcool coniferil poderiam ser ligados covalentemente a glicoproteínas de parede celular (Writmore, 1978) e ligninas, protegendo os sacarídeos de parede celular dos sacarídeos fúngicos; 3. a lignificação da parede poderia restringir a difusão de enzimas e toxinas dos fungos para o hospedeiro e de água e nutrientes do hospedeiro para o fungo, levando-o a morte por inanição; 4. alguns precursores fenólicos de lignina de baixo peso molecular, e de radicais livres produzidos durante a polimerização, apresentam atividade anti-fúngica, podendo inativar as membranas fúngicas, enzimas, toxinas e elicitores. 5. o ápice da hifa poderia se tornar lignificado e perder a plasticidade necessária ao crescimento. O micélio poderia absorver lignina e paredes fúngicas contendo quitina, celulose e proteína rica em hidroxiprolina, que servem como matrizes para a polimerização dos precursores de lignina (Writmore, 1978).

Algumas evidências mostraram claramente que a lignificação protege tanto as paredes celulares quanto as papilas da digestão por enzimas fúngicas. Papilas lignificadas e halos de aveia apresentaram-se altamente resistentes a degradação por uma mistura de enzimas de 14 espécies de fungos (Ride, 1980). Tal resistência foi aparente durante 12 horas após a inoculação, evidenciando a importância de pequenas concentrações de lignina. Entretanto, quando foi feita a

extração de lignina presente na papila ou na parede celular, ocorreu a digestão da mesma pela mistura de enzimas fúngicas (Ride e Pearce, 1979).

A especificidade da lignificação reside, mais provavelmente, na operação de elicitores e receptores de não ligninas em eventos de reconhecimento, que levam a indução da lignificação. Conseqüentemente, os produtos da lignificação não necessitam reagir especificamente com componentes dos fungos ou dos hospedeiros, para que ocorra a especificidade. Evidências de experimentos de proteção induzida indicam que, quando o potencial de lignificação é induzido, o mecanismo é efetivo não apenas contra patógenos incompatíveis, mas também contra patógenos compatíveis (Vance, Kirk e Sherwood, 1980).

A indução da lignificação em trigo parece quase específico para filamentos fúngicos (Pearce e Ride, 1978). Fungos saprofiticos e patogênicos induzem a lignificação; já levedos e bactérias são fracos elicitores. Isto sugere que microrganismos taxonomicamente relacionados podem atuar de forma diferenciada como elicitores. Similarmente, Lisker e Kué (1977) observaram que produtos de oomicetos diferem daqueles de ascomicetos na indução da produção de terpenoides em batata.

Em trigo, foi evidenciado que os tecidos formados durante a cura de células injuriadas sintetizavam lignina (Adirkaram et al., 1992).

A lignina forma ligações ésteres com os polímeros de ácidos graxos para a produção de suberina, de forma similar àquelas ocorridas na cutina para a produção de suberina. Células suberizadas são raramente penetradas por patógenos (Kolattukudy, 1980).

Quando as plantas são injuriadas elas formam uma “periderme de ferimento” que as protege. Este processo de suberização resulta na formação de vários polímeros de lipídeos, suberina e fenólicos, parecidos com a lignina, na deposição da parede celular. O modelo proposto por Kolattukudy e Espelie

(1985) inclui a ligação ester aril-alquilas entre os ácidos, sendo estas as ligações inter-moleculares mais freqüentes.

A suberização também parece estar envolvida na adaptação das plantas a certas condições de estresse. Ela sela os ferimentos de órgãos subterrâneos (Kolattukudy e Dean, 1974), assim como em frutos e folhas (Dean e Kolattukudy, 1976). A chamada lignina de ferimento formada em resposta a injúria em muitos casos, pode ser de fato suberina (Kolattukudy, 1981).

A biossíntese de componentes aromáticos de suberina provavelmente segue a mesma via estabelecida para a lignificação (Gross, 1977).

A suberização provavelmente envolve a polimerização de monômeros aromáticos catalizados por peroxidases. Durante a suberização, os ácidos  $\omega$ -hidroxioleicos são oxidados a seus correspondentes ácidos dicarboxílicos. A deposição destes compostos alifáticos de suberina inicia-se cerca de 3 dias após o ferimento, tendo sido observado que durante o 5º e 6º dia há uma deposição mais rápida. O processo é completado em torno do 8º dia após o ferimento (Kolattukudy e Dean, 1974).

Aparentemente, algum sinal químico gerado pelo ferimento de tecidos vegetais, é o responsável pelo desencadeamento da suberização. A deposição de suberina está freqüentemente associada à renovação da divisão celular, durante a formação da periderme do ferimento (ferimento do cortex), nas superfícies injuriadas. Ceras associadas a polímeros de suberina são as maiores barreiras à perda de água dos tecidos injuriados (Brown, 1989).

Em tecidos de raízes de cenoura feridos e infectados por *Botrytis cinerea*, evidenciou-se a formação de barreiras a partir de suberina e lignina, após 2 e 6 dias, respectivamente (Harding e Heale, 1980).

A formação de barreiras nas paredes celulares de células feridas é responsável pela resistência a muitas doenças pós-colheita (Brown, 1989).

Pesquisas evidenciaram a redução significativa da infestação de citrus (Brown, 1973), e maçãs (Lakshminaraya et al., 1987), por *Penicillium* sp, quando as injúrias superficiais se tornaram lignificadas. Em raízes de cenoura injuriadas e inoculadas com fungo (podridão aquosa), constataram que a presença de lignina e suberina estava envolvida na resistência; entretanto, a presença de substâncias antifúngicas foi mais significante na promoção de resistência (Garrod et al., 1982).

Em plantas de pepino, observou-se que a resistência ao fungo *Cladosporium cucumerium*, se correlacionava diretamente com a deposição mais rápida de lignina, quando comparadas às plantas susceptíveis. O papel da lignificação, como uma resposta geral de defesa, tem também evidenciado que a resistência sistêmica, induzida no pepino, estava associada com o aumento da deposição de lignina nos sítios de penetração (Bar-Nun e Mayer, 1990).

A especificidade da lignificação induzida é dirigida pelo potencial genético dos microrganismos para induzir a lignificação e pelo potencial genético de plantas à resposta (Vance, Kirk e Sherwood, 1980).

Evidências obtidas a partir de experimentos de lignificação sugerem que mais de um elicitor pode interagir com um simples receptor de membrana, ou que dois ou mais receptores podem, independentemente, ativar um dado mecanismo de resistência. Por exemplo, a quitina, um constituinte normal da parede dos fungos ascomicetos e basidiomicetos (Bartnicki-Garcia, 1968), elicita a lignificação de folhas de trigo. Paralelamente, um produto de *Botrytis cinerea*, provavelmente, ser um componente da mucilagem que elicita a lignificação em trigo em dosagens menores do que a quitina. Portanto, ou o trigo possui um único receptor capaz de induzir a lignificação, o qual pode ser ativado por dois elicitores distintos, ou o trigo possui dois receptores que estão associados com a lignificação. Esta evidência fornece um forte argumento para a existência de múltiplos receptores de

elicitores. É possível que um receptor possa se ligar a diferentes elicitores com diferentes eficiências. Isto poderia regular variações quantitativas na taxa de infecção e tamanho da lesão (Vance, Kirk e Sherwood, 1980; Miller, 1989).

A supressão da lignificação pode servir como um mecanismo para induzir a susceptibilidade. Produtos de um patógeno compatível podem atuar bloqueando sítios dos receptores para a indução da lignificação. Produtos fúngicos, alternativamente, podem se ligar aos polímeros de parede celular do hospedeiro, os quais, normalmente, formam a matriz para a deposição da lignina, e bloquear a lignificação. Em outras doenças onde os patógenos compatíveis induzem a lignificação, estes podem metabolizar ou tolerar os intermediários da lignina no ponto de crescimento do fungo (Vance, Kirk e Sherwood, 1980).

## **2.5.2 Respostas químicas**

### **2.5.2.1 Fenilalanina amônia-liase (FAL)**

A fenilalanina amônia-liase (FAL; EC.4.3.1.5) é a primeira enzima da biossíntese dos compostos fenólicos, em plantas superiores, sendo uma ponte entre o metabólito primário, a fenilalanina, e o metabólito secundário. A enzima FAL cataliza a reação de síntese do ácido cinâmico pela conversão da L-fenilalanina em ácido cinâmico, com a liberação de uma molécula de amônia (Stafford, 1974; Hanson e Havir, 1981).

Segundo Giacomini e Szalay (1996), a indução da taxa de síntese da FAL está relacionada à síntese do mRNA, mas a concentração da enzima ativa é

dependente não apenas da taxa de síntese, mas também da taxa de inativação da enzima.

O incremento da atividade da FAL tem sido apontado por ser um indicador de elicitação. O elicitor induz a síntese “de novo” da enzima, aumentando, conseqüentemente, o fluxo através de um passo regulatório chave, acarretando o aumento de fitoalexinas isoflavonóides e da biossíntese de fenólicos de parede celular, como por exemplo, a lignina. O incremento da atividade da FAL, dependente de elicitor, é precedido pelo aumento da transcrição de alguns dos genes da FAL (Bolwell et al., 1991).

Trabalhos prévios indicaram que os genes da FAL eram estimulados por: ferimentos, exposição a elicitores (microbianos ou abióticos), exposição a luz ultra-violeta, assim como pela exposição a patógenos microbianos (Hahlbrock e Scheel, 1989).

Foi evidenciado que a lignificação induzida ao redor do sítio de penetração de inóculo, ou no centro de infecção, era, geralmente, acompanhada pelo aumento da atividade da FAL, TAL e  $\sigma$ -metiltransferase. O aumento da atividade destas enzimas ocorria em decorrência da indução da biossíntese da lignina, o que poderia refletir na ativação ou indução do complexo multi-enzimático associado a sua biossíntese (Maule e Ride, 1976).

Em folhas de alface, Ke e Saltveit (1989) constataram que o ferimento induziu a alta atividade da FAL nas células localizadas até 2,5 cm de distância do sítio de ferimento, sugerindo a existência de um sinal para a sua indução, que provavelmente seria transmitido do ferimento para os tecidos não feridos.

Já em folhas de trigo infectadas com o fungo responsável pela ferrugem, segundo Southerton e Deverall (1990), o aumento inicial dos níveis da FAL poderia estar associado com uma expressão de resistência.

Em tecidos feridos de batata, de acordo com Borchert (1978), não havia dúvida de que o ferimento era responsável pela indução da ativação da biossíntese dos fenil propanóides, incluindo a biossíntese da FAL, sendo um pré-requisito necessário para a biossíntese de ácido clorogênico e de componentes fenólicos da suberina (materiais lignáceos).

Em segmentos de pecíolos de tomate inoculados com *Verticilium albo-atrum* observou-se que a parede celular dentro do sistema vascular era recoberta por um material previamente sintetizado, dependente da FAL. O material de cobertura foi reportado como sendo parecido com a lignina, formado a partir de um polímero alifático, contendo um material fenólico derivado da síntese "de novo", do metabolismo dos fenilpropanóides. Verificou-se também que as mesmas células de pecíolo de tomate, quando foram cultivadas em cultura em suspensão, e posteriormente inoculadas com o mesmo fungo, apresentavam elevação da atividade da FAL. Uma indução marcante da FAL em cultura de células de tomate, diante da inoculação de fungo, foi acompanhada pela acumulação do mRNA da FAL (Bernards e Ellis, 1991).

Em várias outras interações entre patógeno e hospedeiro, foi evidenciado o aumento da atividade da FAL, tendo sido associado, também, com a produção de fitoalexinas (Zähringer, Ebel e Grisebach, 1978; Dixon e Lamb, 1979).

O controle da atividade da FAL na produção de fitoalexinas, durante a interação planta-parasita, tem sido debatido em decorrência dos danos mecânicos também estarem associados ao aumento da atividade da FAL (Cam e Towers, 1973).

Além da elicitação por injúrias e ou patógenos, o tratamento de tecidos de plantas com etileno aumentou, também, a atividade da FAL e de pelo menos mais 3 enzimas envolvidas na biossíntese de lignina, isto é: FAL, ácido 4-hidroxilase

cinâmico, ácido-CoA ligase cinâmico e peroxidase associada a parede celular (Ridge, 1975).

Em células de tecidos foliares de alface (*Lactuca sativa* L.), o aumento da atividade da FAL induzida pelo ferimento ocorreu mais rapidamente do que a induzida pelo etileno, o que levou os autores a concluírem que a atividade da FAL induzida pelo ferimento não era decorrente da produção de etileno induzida pelo ferimento, mas era consequência do próprio ferimento (Ke e Salveith, 1989).

Em trabalho realizado com folhas de duas linhagens de trigo, infectadas pelo fungo responsável pela ferrugem de folhas, observou-se que a atividade da FAL declinou rapidamente entre 20 e 24 horas após a inoculação, sugerindo ocorrer também um processo de inativação da enzima (Southerton e Deverall, 1990).

Acredita-se que o efeito inibitório da atividade da FAL possa estar ligado ao requerimento do cálcio em vias metabólicas (Bolwell et al., 1991)

#### **2.5.2.2 Peroxidase (POD)**

A peroxidase (E.C. 1.11.1.7, POD, hidrogênio peróxido oxireductase) é uma enzima amplamente distribuída nas plantas superiores, estando associada a várias funções metabólicas primárias e secundárias (Lagrimini, 1991; Siddiq, Sinha e Cash, 1992).

A peroxidase catalisa a oxidação de alguns compostos amínicos aromáticos de certos fenólicos na presença de  $H_2O_2$ , com posterior formação de polímeros escuros, tendo sido reportado por Balls e Hale (1934) a necessidade

como substrato de dois (ou mais) anéis de benzeno substituídos, sendo orto ou para.

Desta forma, a peroxidase atua catalisando a polimerização de álcoois cinâmicos, associados à parede celular (Harkin e Obst, 1973).

Peroxidasas de parede celular podem também catalisar a formação de ligações covalentes entre o álcool coniferil e o ácido ferrúlico assim como com os carboidratos ou proteínas da parede celular (Whitmore, 1970).

Na parede celular, a peroxidase é conhecida por desempenhar papel chave na plasticidade (Zheng e Van Huystee, 1992), atuando como reguladora do crescimento celular. Ela também catalisa as modificações das inter-conecções entre macromoléculas, envolvendo a lignina, hemicelulose, glicoproteínas e moléculas aromáticas, tais como o ácido ferrúlico e a tirosina (Talbot e Ray 1992), estando desta forma envolvida na resposta ao estresse, assim como no mecanismo de defesa contra patógenos (Sherf e Kolattukudy, 1993).

A lignificação e o espessamento da parede celular são respostas bem conhecidas de defesa das plantas aos patógenos, particularmente aos fungos.

Pesquisas evidenciaram um aumento de duas vezes na atividade total da peroxidase durante a lignificação (Abeles e Biles, 1991).

Nos trabalhos iniciais, realizados por Balls e Hale (1934) em tecidos injuriados de maçãs, constatou-se a capacidade de escurecimento dos tecidos na ausência de ar, diante da adição de  $H_2O_2$ . Este escurecimento foi então, atribuído a ação da peroxidase. Posteriormente, Reyes e Luh (1960) caracterizaram a POD em pêssegos, relacionando-a com as reações de escurecimento.


O estudo da POD durante o processo de amadurecimento, em um grande número de frutos, foi realizado posteriormente. Haard (1977) revisou os papéis fisiológicos da POD na pós-colheita de frutos e hortaliças, com ênfase na biossíntese de lignina e metabólitos de estresse.

No que diz respeito à natureza química e à localização das peroxidases, Siddiq, Sinha e Cash (1992), evidenciaram serem glicoproteínas e estarem localizadas intracelularmente, nos tecidos vegetais. Estudos com a utilização de técnicas histoquímicas também evidenciaram a presença da peroxidase nos vacúolos, no tonoplasto, na plasmalema, assim como associada a parede celular (Van Huystee e Zheng, 1993), podendo, também, se encontrar solubilizada nos espaços intercelulares (Mader, 1976).

Segundo Haard e Marshall (1976), a peroxidase está presente em tecidos de plantas nas formas solúvel, ionicamente ou covalentemente associada. Com relação as suas funções, em estudos envolvendo pêssegos, observou-se que as mesmas poderiam ser ácidas e básicas (Abeles e Biles, 1991). As peroxidases ácidas se localizam na parte interna da parede celular (Espelie, Franceschi e Kolattukudy, 1986), e estão associadas com o processo de suberização (Abeles e Biles, 1991), tendo sido estudadas em amendoim, algodão e milho (Kim et al., 1988). As peroxidases básicas foram evidenciadas por estarem associadas à lignificação em cultura de células foliares de pêssegos (Bruce e Galston, 1989).

Durante a lignificação, constatou-se o aumento nas concentrações, assim como na diversidade das isoenzimas peroxidásicas básicas. Entretanto, existem outras enzimas envolvidas na produção de precursores de fenilpropanóides, que desempenham um papel de maior importância no controle da formação de lignina (Abeles e Biles, 1991).

De acordo com Zheng e Van Huystee (1992), existem evidências de que várias peroxidases aniônicas fazem parte do sistema de defesa ativa de plantas, como demonstrado em tabaco e amendoim. Já as peroxidases catiônicas, regulam o alongamento celular dos segmentos de hipocótilo de amendoim, catalisando as ligações cruzadas de compostos fenólicos de parede. Gaspar et al. (1985), sugeriram haver um papel interdependente das peroxidases ácidas e básicas no



fortalecimento da parede celular em resposta a diferentes estímulos físicos e químicos.

Uma série de pesquisas evidenciaram a presença de POD em plantas. Em tecidos excisados de medula de tabaco, foi observado durante as reações de escurecimento enzimático, a síntese de uma isoenzima da peroxidase aniônica. A reação de escurecimento, constatada em plantas injuriadas, é consequência da deposição de ácidos polifenólicos, que podem se ligar às proteínas, e a outros constituintes da parede celular (Lagrimini, 1991).

Foi observado que o ferimento de cotilédones, levou à indução de peroxidases aniônicas e à deposição gradual de polímeros fenólicos de parede celular, particularmente na camada de células imediatamente abaixo da superfície ferida. Dentre as várias peroxidases induzidas pelo ferimento, três bandas aniônicas específicas se correlacionavam com a deposição de polímeros de fenólicos (Graham e Graham, 1991).

Bell (1981) observou que, as peroxidases moderadamente aniônicas estavam presentes em grandes concentrações, em resposta a ferimentos. As peroxidases altamente aniônicas estavam associadas à parede celular de células e atuavam na polimerização de álcoois sinamil "in vitro".

Com relação às isoperoxidasas catiônicas, estas são isoenzimas induzidas diante de uma injúria ou doença. Isoenzimas catiônicas de milho (*Zea mays*), por exemplo, apresentaram aumento, em resposta a injúria provocada por corte e infecção fúngica (Birecka, Catalfamo e Urban, 1975). Em rabanete (*Raphanus sativus*), uma isoperoxidase catiônica tem sido sugerida como sendo a primeira isoenzima envolvida na regulação da formação da lignina em resposta à doença (Ohguchi e Assada, 1975). Resultados semelhantes foram obtidos em grama (*Phalaris arundinacea* L.) por Vance, Anderson e Sherwood (1976).

Peroxidases ácidas ou aniônicas estão freqüentemente associadas com a lignificação e a suberização (Goldberg, Imberty e Chu-Ba, 1986), ao passo que as isoenzimas básicas ou catiônicas, catalisam uma variedade de reações associadas com as ligações cruzadas oxidativas entre os polissacarídeos e as proteínas de parede (Van Huystee e Zheng, 1993), e parecem estar envolvidas no controle do crescimento e alongamento celular (Gaspar et al., 1985; Van Huystee e Zheng, 1993).

Outro aspecto associado à complexidade dos papéis das isoenzimas peroxidases é a variação da localização das peroxidases aniônicas e catiônicas. Em estudo realizado "in vitro", evidenciou-se que algumas peroxidases catiônicas ocorriam no meio de cultura e no citoplasma, ao passo que muitas peroxidases aniônicas ocorriam na parede celular (Zheng e Van Huystee, 1991).

A atividade da peroxidase em plantas doentes e seu efeito na resistência ou susceptibilidade, em muitas interações patógeno-hospedeiro, assim como o papel da peroxidase nas reações de defesa das plantas resistentes, tem sido bastante estudado.

Investigações evidenciaram que a atividade da peroxidase é uma marca bioquímica que pode ou não ser um mecanismo de resistência, mas pode ser usada para predizer a resistência a doenças. Em estudos realizados com 12 cultivares de tomates e 4 de melões, de linhagens cultivadas, foi observada uma alta correlação entre a atividade da peroxidase em frutos não infectados e a resistência ou susceptibilidade a *Verticillium dahliae* ou *Sphaerotheca fuliginea* (Reuveni et al., 1992).

Uma prova da atuação da peroxidase na resistência de plantas a doenças é o seu envolvimento na oxidação de fenóis, propiciando a formação de lignina, que, por sua vez, aumentaria a resistência física da parede celular, dificultando a penetração (Vance e Sherwood, 1976).

Em trabalho realizado com folhas de pepino, observou-se que a atividade de várias isoenzimas peroxidásicas aumentava em cerca de três vezes quando eram inoculadas com fungos, bactérias ou vírus (Ryan, 1983).

Na interação entre o fungo responsável pela ferrugem e plantas de trigo, constatou-se o aumento da atividade da peroxidase durante a resistência a doenças (Southerton e Deverall, 1990).

Em experimento realizado com frutos de tomate foi evidenciado que tanto nas cultivares resistentes quanto nas susceptíveis, a atividade da POD aumentou marcadamente 24 horas após a inoculação do patógeno, não tendo sido observado diferenças significativas entre os dois tipos de plantas. A atividade da POD alcançou um máximo, 72 horas após a inoculação. Foi observado que a atividade da POD foi maior nas áreas bem próximas à região necrótica, formada 100-120 horas após a inoculação, tanto em plantas infectadas susceptíveis quanto em resistentes, decrescendo marcadamente em células localizadas a 2 cm de distância (Bashan, Okon e Henis, 1987).

Em plantas de melão, a atividade da peroxidase esteve positivamente correlacionada com os vários níveis de resistência à infecção com *P. cubensis* (Reuveni et al., 1992).

Graham e Graham (1991) constataram a síntese de uma isoenzima peroxidásica aniônica em tecidos excisados de medula de tabaco, assim como em cotilédones feridos, durante as reações de escurecimento.

Portanto, mudanças na atividade das isoenzimas peroxidases, como consequência de diversos tipos de estresses ou de variações nas condições fisiológicas, tem sido bem documentadas, tendo sido demonstrado uma relação sequencial entre isoenzimas básicas e ácidas.

### **2.5.2.3 Polifenoloxidase (PFO)**

A polifenoloxidase (monofenol dihidroxifenilalanina monoxigenio oxireductase: E. C. 1.14.18.1: PFO), também conhecida como fenolase, fenol oxidase, catecoloxidase e tirosinase, é amplamente distribuída nas plantas (Wesche-Ebeling e Montgomery, 1990).

Segundo Whitaker (1972), as reações oxidativas, associadas com um escurecimento indesejável de tecidos danificados de frutos e hortaliças frescos, são catalisadas pela enzima polifenoloxidase (PFO). A enzima está provavelmente presente em todas as plantas, mas sua atividade é particularmente alta naquelas que contêm significantes níveis de compostos fenólicos.

A PFO catalisa a formação de quinonas altamente reativas, que reagem com grupamentos amino ou sulfidril de proteínas ou enzimas. Estas reações levam a mudanças físicas e químicas alterando o conteúdo nutricional do vegetal, e em muitos casos, a inativação de enzimas, incluindo a própria PFO (Anderson, 1968).

A enzima tem sido indicada como a responsável por muitas reações de escurecimento durante o manuseio, armazenamento e processamento de frutos (Mayer e Harel, 1979; Bower e Cutting, 1988), assim como reações oxidativas associadas com o escurecimento e descoloração indesejáveis em muitos tecidos de frutos e hortaliças frescos injuriados (Luh e Phithakpol, 1972; Siddiq, Sinha e Cash, 1992).

As reações de escurecimento podem afetar tanto o aspecto nutricional quanto a aparência de frutos e vegetais (Joslyn e Ponting, 1951), podendo também, levar à perda da cor em tecidos contendo antocianinas (Co e Markakis, 1968).

Com relação à localização intracelular da PFO, em folhas de chá e em tubérculos de batata, constatou-se que a enzima se localizava, predominantemente, nos tilacóides dos cloroplastos. Por outro lado, em folhas jovens e em folhas adultas de cana de açúcar, a PFO foi evidenciada nos peroxissomas (Flurkey e Jen, 1978).

Em pêssegos, a PFO tem sido descrita como uma proteína de membrana, que é ativada ou pela ruptura da membrana ou pela atuação de enzimas proteolíticas (Sanchez-Ferrer, Bru e Garcia-Carmona, 1989). Com relação à localização, foi observado que a PFO estava presente tanto nos tecidos do endocarpo quanto no mesocarpo, estando mais firmemente associada ao endocarpo (Abeles e Biles, 1991).

Muitas formas de PFO têm sido isoladas de uma série de fontes, diferindo, marcadamente, no peso molecular (Wissemann e Lee, 1981).

Em preparações de PFO em tecidos de pêssego (*Prunus persica* Batsch cv. Redskin) Wong, Luh e Whitaker (1971) e Flurkey e Jen, (1980) evidenciaram muitas formas de isoenzimas

No que diz respeito às reações de escurecimento, estas ocorrem em muitos frutos quando os tecidos são injuriados, descascados ou se apresentam doentes. Estas reações são decorrentes da conversão de compostos fenólicos em quinonas, pela ação da PFO, através da polimerização, o que leva a uma coloração escurecida (Park et al., 1980).

Em pêssegos, Jen e Kahler (1974) evidenciaram que a atividade específica da PFO poderia ser positivamente relacionada com o descoloração dos frutos durante a pós-colheita

Foi evidenciado que, quando os tecidos de pêssego foram mecanicamente feridos após a colheita ou durante o processamento, por um atraso no processo de aquecimento, após a retirada da casca, a enzima PFO atuava catalisando a

oxidação de compostos fenólicos formando quinonas, que quais se polimerizam, subsequêntemente, formando pigmentos de coloração escurecida (Luh e Phithakpol, 1972).

O escurecimento é um problema sério, uma vez que é geralmente acompanhado por mudanças na cor, “flavor” e valor nutritivo, afetando, grandemente a qualidade do produto final. Associado ao processo de escurecimento, tem sido também evidenciado o envolvimento de PFO na resistência de plantas a doenças, estando relacionado com a formação de quinonas (Mazzafera, Gonçalves e Fernandes, 1989).

Em plantas de tomate feridas e inoculadas com *Pseudomonas syringae*, observou-se que, 48 horas após a injúria, a PFO apresentou alta atividade. Constatou-se também que a atividade da PFO, assim como o conteúdo de fenólicos, foram superiores em plantas que haviam sido injuriadas e inoculadas, quando comparadas às plantas que foram apenas injuriadas, tanto em plantas resistentes, quanto em susceptíveis. Entretanto, observou-se que os valores de PFO foram superiores em plantas resistentes em relação às susceptíveis (Bashan, Okon e Henis, 1987).

Kué (1966), sugeriu que o aumento da atividade da PFO, seguindo a interação hospedeiro-parasita, resultaria de uma indução não específica da resistência de plantas.

## 2.6 Parede celular

### 2.6.1 Constituição

A parede celular é uma estrutura resistente que circunda externamente o plasmalema das células vegetais. No nível biológico, atua na morfologia, assim como na fisiologia das mesmas. Delimita, estando envolvida, também, na expansão das células (Goodwin e Mercer, 1983).

A parede celular é constituída por camadas a partir da mais externa: lamela média, parede primária, e parede secundária, está sendo caracterizada por possuir uma rede de agregados organizados de moléculas de celulose, denominadas microfibrilas, embebidas em uma matriz de polissacarídeos não celulósicos e de lignina (Eskin, 1979).

A lamela média é depositada durante a divisão celular e atua conectando ou fazendo a coesão entre as células adjacentes, sendo conhecida como substância cimentante. É composta por substâncias pécticas, constituídas principalmente por polímeros de ácido galacturônico, que podem ser esterificados ou não. A alteração da coesão entre as células ocorrerá caso haja qualquer modificação nas características das pectinas presentes (Malis-Arad et al., 1983; Selvedran e O'Neil, 1987; Brett e Waldron, 1990).

Os polímeros pécticos constituintes da lamela média são, predominantemente, lineares, com cadeias curtas laterais, formadas por açúcares neutros, predominantemente a arabinose e a galactose, que são presos aos resíduos de ramnose de cadeias de ramnogalacturonanas. Estas cadeias são formadas de regiões com resíduos não esterificados, intercalados com regiões que são altamente esterificadas e ramificadas. Intercalados a estas, estão também presentes resíduos não esterificados, que são mantidos por ligações com íons de

cálcio (Brett e Waldron, 1990). Estes podem ser extraídos através de agentes que removem o cálcio por complexação.

Poliuronídeos com alto grau de metoxilação são capazes de formar poucas ligações com o cálcio, e os complexos formados são lábeis. Então as moléculas são de-esterificadas, resultando em grupos negativamente carregados, que se repelem entre si e causam dilatação dos complexos. Por outro lado, poliuronídeos com um baixo grau de metoxilação, formam numerosas ligações com o cálcio, e complexos estáveis com poliuronídeos, que são fortemente afetadas quando de-esterificados (Yoshioka, Aoba e Kashimura, 1992).

Em estudo realizado em maçãs, foi observada uma distribuição intermolecular irregular dos grupos metoxil dos poliuronídeos. Desta forma, foi proposto um modelo para os poliuronídeos, no qual, as moléculas seriam formadas por regiões com homogalacturonana e regiões com heterogalacturonana (de Vries et al., 1981, 1983).

Yoshioka, Aoba e Kashimura (1992), em trabalho realizado durante o amolecimento de pera e maçã, sugeriram, como um possível mecanismo para a solubilização de poliuronídeos, a deesterificação de poliuronídeos com alto grau de metoxilação.

No que diz respeito as paredes celulares primária e secundária, estas são constituídas de celulose, hemicelulose e pectina em diferentes percentagens. Em relação à lamela média, a parede celular primária apresenta um maior grau de organização (Brett e Waldron, 1990), sendo constituída por uma fase microfibrilar e uma matriz.

A parede celular primária é depositada durante a divisão celular e posterior crescimento da célula. É uma camada fina e apresenta alto grau de organização, quando comparada à lamela média. Apresenta em sua constituição,

além da pectina (34%), hemicelulose (24%), celulose (23%), e glicoproteína rica em hidroxiprolina (19%) (John e Dey, 1986).

De acordo com Van Buren (1973), a celulose confere rigidez e resistência a parede celular, ao passo que as substâncias pécticas e as hemiceluloses conferem plasticidade e elasticidade.

A fase microfibrilar apresenta alto grau de cristalinidade, sendo constituída por moléculas de celulose. Estas são cadeias lineares unidas por ligações  $\beta$  - 1,4, ligadas entre si através de pontes de hidrogênio, formando, desta forma, uma malha bem estruturada e estável, onde se organizam os demais polímeros que constituem o gel da matriz (Breet e Waldron, 1990).

Foi constatado, em pêssegos "Elberta", durante o processo de amadurecimento, mudanças no tamanho micelar da celulose e na percentagem de cristalinidade, que é o valor relativo de celulose organizada em micélios cristalinos (Sterling, 1961).

A matriz é formada a partir de substâncias pécticas, cujo esqueleto básico é constituído por  $\alpha$  - 1,4 galacturonana, associadas à resíduos de ramnose, que por sua vez, podem atuar como pontos de ramificação, onde irão se ligar às cadeias laterais de açúcares neutros, principalmente a galactose e arabinose. Em regiões muito ramificadas, as cadeias laterais tendem a formar blocos, ligando pectinas a hemiceluloses (Mangas et al., 1992).

Os polímeros pécticos são altamente ramificados com cadeias laterais mais longas que aquelas presentes na lamela média. As cadeias de ramnogalacturonanas apresentam baixo grau de metilação (Selvedran e O'Neill, citados por Fisher, Arrigoni e Amado, 1994).

Ácidos poliurônicos são significantes componentes estruturais do complexo lamela média-parede celular primária, de plantas superiores. Estes polissacarídeos ácidos, são de importância característica do domínio amorfo dos

sistemas de tecidos de plantas, apresentando substancial capacidade de troca iônica, o que pode afetar o coeficiente de atividade potencial transmembrana e, conseqüentemente, o fluxo iônico (Van Cutsem e Gillet, 1982; 1983, citados por Irwin et al., 1985).

Associados covalentemente às pectinas, e através de pontes de hidrogênio com a celulose, se encontram as hemiceluloses, polímeros formados por açúcares neutros como: xilose, glicose, fucose e manose. Estes se polimerizam formando xiloglucanas, glucomanas ou galactoglucomanas (Gross, 1990).

A celulose e a xiloglucana são importantes componentes estruturais das paredes primárias das plantas (McCann e Roberts, 1994). Ambas são polissacarídeos compostos por um esqueleto de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucan. Na celulose, estas cadeias associam-se lateralmente por ligações de hidrogênio, para formarem microfibrilas. A própria associação das moléculas de xiloglucana é impedida por um grande número de cadeias laterais (Hayashi, 1989). Apesar da celulose e xiloglucana serem unidas em diferentes localizações, existe uma íntima interação entre estes dois polissacarídeos existe "in vivo". Na parede celular primária, as microfibrilas celulósicas são extensivamente recobertas com xiloglucanas (Hayashi, 1989), que evitam sua agregação em complexos celulósicos maiores (McCann, Well e Roberts, 1990; Acebes et al., 1993), ocorrendo apenas pequenos valores de celulose "nua" (Hayashi e MacLachlan, 1984).

O grau de metil esterificação (GE) das xiloglucanas não tem sido considerado um fator importante na associação do complexo celulose-xiloglucana (Vincken et al., 1995).

A característica de acidez de um polissacarídeo advém da alta proporção de ácido galacturônico na pectina. A adição ou remoção dos ésteres metílicos, a partir de resíduos de ácido galacturônico, é o recurso utilizado pela planta para alterar esta característica. Todavia, o grau de metilesterificação de um tecido

vegetal é dependente, por exemplo, do tipo ou do estágio de desenvolvimento do mesmo (Maness, Ryan e Mort, 1990), sendo determinante da habilidade da pectina de formar ligações cruzadas com o cálcio, pela alteração e distribuição de cargas na molécula. Podem ser necessários, no mínimo, sete resíduos de ácidos metilesterificados, para que uma ligação cruzada de cálcio entre cadeias adjacentes de pectina seja estabilizada (Powell et al., 1982).

A esterificação elimina a carga elétrica, e portanto, o sítio de ligação para o cálcio. A clivagem dos ésteres metílicos pela enzima pectinametilesterase (PME), não apenas permite as ligações cruzadas de grupos carboxílicos vizinhos com o cálcio, mas também geram uma matriz negativamente carregada que pode induzir decréscimo localizado do pH envolvido no processo de crescimento (Kim e Carpita, 1992).

No que diz respeito às proteínas que se encontram associadas à parede celular, sabe-se que a maioria delas são glicosiladas, sendo a extensina a proteína mais conhecida. Esta apresenta, em sua constituição, cerca de 40% do aminoácido hidroxiprolina, além da serina e lisina. Pesquisas tem evidenciado que, durante o amadurecimento de frutos, ocorre um aumento nas ligações cruzadas entre as proteínas ricas em hidroxiprolina, o que aparentemente acarreta na paralização da expansão celular (Knee, Sargent e Osborne, 1977).

### **2.6.2 Modificações da parede celular por ocasião da maturação dos frutos e ataque fúngico**

No que diz respeito às mudanças ocorridas na parede celular durante o período de amadurecimento dos frutos, observou-se haver solubilização da

mesma, resultando na quebra de ligações covalentes, assim como a incorporação constante de material sintetizado, o que leva a um equilíbrio dinâmico entre os seus constituintes (Labavitch, 1981; Michan, Gross e Ng, 1991).

O amaciamento, que ocorre em alguns frutos, é decorrente das mudanças no metabolismo dos carboidratos de parede celular, resultando no decréscimo líquido de certos componentes estruturais. As mudanças na composição da parede celular resultam da ação de enzimas hidrolíticas produzidas pelo fruto. Podem ser observados aumento contínuo na atividade das enzimas poligalacturonase (PG) e pectinametilesterase (PME) durante o amadurecimento dos frutos, associados a mudanças notáveis no conteúdo de pectina (Sethu, Prabha e Tharanathan, 1996).

Em pêssego, por exemplo, foi observado a solubilização das pectinas durante o amadurecimento dos frutos (Melford e Prakash, 1986; Holland, 1993).

Associada à solubilização das pectinas, ocorre também uma perda líquida de resíduos de açúcares neutros não celulósicos, como evidenciado em pêra, maçã, morango e tomate, durante o amadurecimento dos mesmos (Gross e Sams, 1984).

Em pimenta (*Capsicum annuum*), constatou-se que a perda líquida de resíduos de açúcares neutros durante o amadurecimento envolveu primariamente a galactose e arabinose, seguidos por glicosil, manosil e xilosil (Sethu, Prabha e Tharanathan, 1996).

A análise da composição de polissacarídeos fornece informações importantes acerca da abscisão de folhas e frutos, dos fatores relacionados a interação parede celular e enzimas degradativas a ela associada, assim como da patogênese de plantas (Jones e Albersheim, 1972).

Diante de uma infecção fúngica, foi evidenciado ocorrer a solubilização parcial de açúcares neutros não celulósicos de polissacarídeos compostos de

ramnosil, arabinosil, xilosil e galactosil, assim como da hidrólise substancial dos componentes poliuronídeos da estrutura da parede celular (Tobias et al., 1993).

A parede celular é a primeira fonte de carbono encontrada pelo fungo patogênico após a penetração inicial na casca ou cutícula da planta hospedeira. Fungos patogênicos produzem enzimas hidrolíticas que degradam os polissacarídeos de parede celular e utilizam os monossacarídeos constituintes como fonte de carbono para seu crescimento e desenvolvimento (Albersheim, Jones e English, 1969).

As glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (extensinas) são importantes componentes estruturais das paredes celulares de dicotiledôneas (Showalter, 1993; Kieliszewski e Lamport, 1994), sendo sintetizadas em resposta a infecção microbiana (Qi et al., 1995). A mais notável característica das extensinas é o seu alto conteúdo de serina e hidroxiprolina (Qi et al., 1995), tendo sido sugerido que a extensina é ligada à pectina via ligação  $\beta$ -3,6 galactana (Keegstra et al., 1973), e que as extensinas são ligadas diretamente entre si, através da ligação via isoditrosina (Cooper e Varner, 1983).

Desta forma, o conhecimento da amplitude das respostas de defesa dos tecidos de pêssago, tanto ao ferimento, quanto ao ataque de patógenos, um dos objetivos do presente estudo, fornecerá informações de grande relevância.

## **2.7 Papel do cálcio nos processos de cura de ferimentos causados por injúrias mecânicas e agentes patogênicos**

— Tem sido observado que no meio extracelular, o cálcio atua diretamente na manutenção da função e estrutura da membrana celular através da ação nos

fosfolipídeos, na disposição das proteínas na superfície externa da membrana e na proteção das membranas contra a degradação lipídica (Helsper et al., 1986, Chéour et al., 1992). Na parede celular, atua na estabilização e amadurecimento de frutos, na provisão de um “pool” de cálcio externo disponível para os requerimentos intracelulares, assim como na modificação do ambiente iônico da interface membrana plasmática - parede celular.

A importância do cálcio na estabilização das membranas foi evidenciada por Marinos (1962), em estudos realizados com o auxílio da microscopia eletrônica.

A proteção da integridade da membrana celular pelo cálcio, durante a senescência, tem sido associada com a habilidade do cálcio de se ligar aos fosfolipídeos da membrana plasmática, estabilizando-a e controlando as funções associadas à membrana (Poovaiah, Glenn e Reddy, 1988). O cálcio atua também, na estabilização da membrana plasmática, contra o fluxo indiscriminado, incluindo o próprio íon (Hanson, 1984).

O cálcio também atua na proteção das membranas contra a degradação lipídica, provavelmente através de vários mecanismos. O cálcio pode estabilizar a plasmalema se ligando as cargas negativas dos grupamentos dos fosfolipídeos, que se tornam menos propensos a degradação por enzimas lipolíticas (Chéour et al., 1992).

Durante o amadurecimento de frutos, o íon atua de forma preponderante. Em tecidos de maçã foi evidenciado um aumento na concentração de cálcio (avaliado por  $\text{cm}^2$  de superfície), a medida que o fruto atingia a maturidade (Harker, Ferguson e Dromgoole, 1988).

A atuação do cálcio no atraso da senescência e na degradação da membrana lipídica foi constatada em discos de folhas de couve, quando tratados com 0,05 M de cálcio. Acredita-se que o íon atue na proteção dos lipídeos da

membrana da ação degradativa de enzimas. Em contraste foi verificado que diante de uma concentração supra-ótima de cálcio (0,25 M), ocorreu a aceleração da senescência e a hidrólise dos lipídeos de membrana (Chéour et al., 1992).

Intracelularmente, o cálcio pode atuar como um mensageiro secundário, fazendo a tradução de estímulos externos em eventos imediatos e metabólicos (Ferguson e Drobak, 1988).

O cálcio é, portanto, um regulador intracelular essencial nas células de plantas, e está envolvido tanto na regulação metabólica quanto no desenvolvimento (Briskin, 1990). A manutenção de baixas concentrações de cálcio livre citoplasmático, cerca de 0,1  $\mu\text{M}$ , é necessária para desempenhar sua função como mensageiro secundário (Hepler e Wayne, 1985), sendo mantida pela ação de um sistema de transporte ativo de cálcio, localizado na membrana plasmática, retículo endoplasmático e tonoplasto (Briskin, 1990; Evans, Briars e Willims, 1991).

A homeostase de cálcio é mantida através de transportadores protéicos. Funcionalmente, estes transportadores se dividem em duas classes: aqueles que mediam o efluxo de cálcio do citoplasma (os  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase e os  $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^{+}$  antiporteres) e aqueles que mediam o influxo de cálcio (os canais de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Evans, 1994). A habilidade das células vegetais de manterem baixas as concentrações de cálcio citoplasmático, é um requerimento chave para a função deste cátion como mensageiro na regulação de eventos metabólicos (Briskin, 1990), e requer um bombeamento ativo do íon para o apoplasto, ou para as organelas (Reddy, 1995).

Segundo Gelli e Blumwald (1993), a elevação da concentração de cálcio livre citoplasmático, a níveis superiores a  $1 \times 10^{-6}$  M, pode levar à ativação de respostas.

Os principais compartimentos de armazenamento intracelular de cálcio são os vacúolos de células maduras de plantas (Gelli e Blumwald, 1993). Será a partir da liberação do cálcio vacuolar que ocorrerá a elevação da concentração do cálcio citosólico livre, partindo de um estado de equilíbrio “steady-state”, com a concentração na faixa de 150 nM para valores superiores a 300 nM (Gehring et al., 1990). Acredita-se que as flutuações nos níveis de cálcio citoplasmático, mediam vários processos fisiológicos nas células das plantas, tais como: fototropismo, geotropismo, ação hormonal, assim como a indução de respostas de defesa dos tecidos vegetais a injúrias (Felle, 1988).

As células vegetais podem distinguir diferentes sinais de cálcio, através das diferenças na organização espacial das mudanças no cálcio citosólico. Por exemplo, quando a concentração do íon é relativamente alta dentro do retículo endoplasmático (Bush, Biswas e Jones, 1989), vacúolo (DuPont et al., 1990), ou espaço extracelular, esta possibilita, a cada um destes compartimentos, servirem como fonte para induzirem o estímulo de aumento do cálcio citosólico. O influxo de cálcio, localizado particularmente nas membranas, associado às baixas taxas de difusão de cálcio no citosol, podem atuar como possíveis gradientes de cálcio (Bush, 1993).

Mudanças rápidas no cálcio citosólico, a partir de níveis basais, ocorrem em resposta a estímulos endógenos, como os hormônios de plantas, ou a estímulos exógenos, tais como: luz, calor, sais, elicitores e injúrias. O tempo de curso das mudanças no conteúdo de cálcio citosólico, induzido por diferentes estímulos, em diferentes células, é bastante variável. Podem ser destacados: aumento transiente e aparentemente grande, que ocorre em resposta a estímulos mecânicos, choque hipotônico, ação de elicitores, aumento ou declínio, aparentemente modesto, que ocorre em resposta a hormônios como giberelina, citocinina, ou luz e mudanças

oscilatórias, com períodos regulares e irregulares, que ocorrem em resposta a ação dos fitormônios: auxina e ácido abscísico (Bush, 1993; Reddy, 1995).

Quando as células vegetais foram colocadas em contato com elicitores de fungos, observou-se uma elevação do cálcio citosólico. Estes são conhecidos por induzirem proteínas associadas a patogênese (Knight et al., 1991).

Pesquisas têm sido direcionadas para o esclarecimento de como o reconhecimento de um estímulo de elicitação conduz a ativação de respostas de defesa (Dixon, Harrison e Lamb, 1994), tendo sido mencionado, em muitos trabalhos, o envolvimento de várias moléculas sinalizadoras, como: cAMP (Kurosaki, Tisurusawa e Nishi, 1987), proteínas G (Legendre, Heinsteins e Low, 1992), fosfóro inorgânico (IP<sub>3</sub>) (Renelt et al., 1993) e Ca<sup>2+</sup> (Kurosaki, Tisurusawa e Nishi, 1987).

Estudos recentes mostraram que o cálcio está envolvido também na expressão de genes induzidos por estresse, tanto biótico quanto abiótico. A interação patógeno-planta, elicitores químicos e um número de outros fatores de estresse, têm sido conhecidos por estimularem a produção de etileno em plantas. Este está envolvido na expressão de algumas biossínteses protéicas, como por exemplo a quitinase. Quando foi utilizado um quelante de cálcio, acarretando na redução do íon disponível, verificou-se o bloqueio da síntese de quitinase, induzido, previamente, pelo etileno. Estes resultados indicam que a indução do gene da quitinase pelo etileno é mediada pelo cálcio (Reddy, 1995).

No que diz respeito à integração patógeno-planta, o alto conteúdo de cálcio nos tecidos do hospedeiro tem, freqüentemente, sido associado com a resistência de plantas. Um bom exemplo de tais associações foi observado por Bateman (1966). Em hipocótilo de feijão lesado e infectado com *Rhizoctonia solani*, constatou-se ocorrer o acúmulo de cálcio. Evidenciou-se que as células

mais próximas às áreas lesionadas, apresentaram-se mais resistentes à maceração do que aquelas localizadas mais distantes, tendo sido atribuído a formação de complexos insolúveis entre o material péctico desmetilado e o cálcio, podendo ocorrer, também, com outros íons multivalentes, presentes nas células infectadas do hospedeiro (resistência tardia). Estes complexos insolúveis conferem a parede celular, resistência a ação de enzimas como a endopoligalacturonase, liberada pelo ataque de patógenos.

O mecanismo pelo qual o cálcio retarda a ação de fungos pode ser similar ao efeito do cálcio no mecanismo que retarda o amadurecimento ou senescência (Conway e Sams, 1983).

Na interação patógeno-planta, o aumento nos níveis de cálcio nos tecidos de vegetais resulta no aumento da resistência do tecido a maceração. Provavelmente, a localização do cálcio nas paredes celulares pode inibir a maceração (MacGuire e Kelman, 1986).

Como resposta de defesa ao ataque de patógenos, o tecido vegetal reage podendo sintetizar calose. Constatou-se que, quando a cultura de tecidos de *Pinus elliotti* foi infectada com *Fusarium subglutinans* e elicitada com cálcio, houve um aumento da calose em 15% em relação às células não elicitadas. A presença de cálcio foi evidenciada 15 minutos após a infecção ou a inoculação dos ferimentos com suspensão de esporos fúngicos, seguida pela formação da calose. Em decorrência da rapidez com que ocorre este processo, acredita-se que ele possa envolver a síntese transcricional “de novo” das enzimas responsáveis pela síntese da calose (Valluri e Soltes, 1990).

O cálcio atua, também, na redução da podridão de frutos. A aplicação pós-colheita de cálcio ( $\text{CaCl}_2$  a 8%, sob pressão) reduziu em 40% o apodrecimento de maçãs Delicious, inoculadas com suspensão de esporos de

*Penicillium expansum* Link ex Thom., e armazenadas por 3 meses (Conway e Sams, 1984).

A explicação mais plausível para o papel do cálcio na redução da podridão em frutos armazenados, é que ele poderia estabilizar ou reforçar a parede celular de frutos, tornando-os mais resistentes ao ataque por fungos. A maioria dos efeitos dos tratamentos pós-colheita de maçãs, com cálcio, tem sido relacionados com a redução das perdas causadas pelas desordens fisiológicas (Bangert, Dilley e Dewey; 1972, Conway e Sams, 1984).

Também em maçãs, foi evidenciado a atuação do cálcio no metabolismo de parede celular, conferindo-lhes, não apenas maior resistência às mudanças que precedem o amaciamento, invasão fúngica ou desenvolvimento de desordens, mas também atrasando a taxa geral de senescência do tecido vegetal (Sharples, 1980).

Ao cálcio, tem sido também, atribuído o papel de elicitador de respostas celulares (Bolwell et al., 1991), e de estar associado a atividade dos compostos fenólicos. A deficiência de cálcio leva ao escurecimento de tecidos, provavelmente devido a ativação da oxidação pela ação das enzimas polifenoloxidasas (Bangert, 1979).

Com relação à síntese de fitoalexinas, tem sido verificado o envolvimento do cálcio na indução das respostas desencadeadas por elicitores (Ishihara et al., 1996).

O cálcio tem sido considerado mensageiro secundário em diversas vias através da transcrição de sinais (Vögeli, Vögeli-Lange e Chappell, 1992).

O conceito de cálcio como mensageiro secundário, significa a existência de "pools" internos de cálcio, que podem prover, mudanças rápidas e transitórias na atividade do cálcio livre do citoplasma. Isto é, uma fonte de cálcio, que pode ser facilmente liberada e rapidamente reabastecida. O reabastecimento pode vir de duas fontes principais. A primeira, advém da reabsorção a partir de citosol, que é

induzida pela liberação do fósforo do retículo endoplasmático. Esta reabsorção pode não ser suficiente para reabastecer o “pool”, particularmente em células de plantas. Tanto as mitocôndrias quanto os vacúolos podem acumular cálcio através das bombas dependentes de cálcio. Em alguns casos, pode ser necessário recorrer a outros pools, como suplemento. A segunda fonte é o pool extracelular (Ferguson e Drobak, 1988).

Desta forma, no meio interno da célula, o cálcio irá atuar como um mensageiro secundário do citossol. Pequenos fluxos de cálcio nas células levariam à regulação de vários processos bioquímicos de forma direta, ou através da calmodulina (Hepler e Wayne, 1985). O cálcio e a calmodulina são abundantes em plantas e têm sido associados a vários processos de tradução de sinais (Vögeli, Vögeli-Lange e Chappell, 1992).

De acordo com a teoria do mensageiro intracelular, o cálcio e um pequeno grupo de outros compostos, desempenhariam um papel chave na tradução de sinais. A percepção dos mesmos ocorreria a partir de receptores e efetores, localizados em outra parte da célula, desencadeando, assim, as respostas celulares (Bush, 1993). O papel do cálcio, como um mensageiro secundário é possível, não apenas através de uma regulação sensível da abertura e do fechamento dos canais de cálcio, mas também através de uma regulação precisa do sistema de transporte, envolvido na sua exclusão do citoplasma (Rasi-Caldogno, Carnelli e Michelis, 1995).

O efeito cascata inicia-se com a interação receptor/estímulo, que leva, através de uma série de passos alternativos, à regulação do transporte de cálcio e a mudança no cálcio intracelular. O aumento dos níveis de cálcio promove, então, a formação de complexos de cálcio, com proteínas alvos, que regulam a atividade de efetores de proteínas, determinando por sua vez a resposta de células (Bush, 1993).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Procedência, coleta e seleção das amostras dos frutos

Foram utilizados frutos de pessegueiro *Prunus persica* (L) c.v. Biuti provenientes da Fazenda Augusto Bertozzi, localizada no município de Santa Rita de Caldas, sul de Minas Gerais. O município situa-se a aproximadamente 900 m de altitude, apresentando coordenadas que variam entre 21° 58' a 21°10' de latitude sul, e 46° a 48° de longitude WGr.

A colheita dos frutos foi feita pela manhã, do dia 20 de dezembro de 1995, no ponto de maturidade comercial. A seguir, os frutos foram pré-selecionados considerando-se a ausência de injúrias visuais e infecções, bem como a uniformidade de tamanho e de cor. Após o acondicionamento em caixas de papelão, utilizadas para comercialização, foram transportados para o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças, do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras

(DCA-UFLA), onde foram novamente selecionados, eliminando-se aqueles que apresentavam algum tipo de injúria, ou que não se enquadravam dentro dos padrões de tamanho e de cor pré-estabelecidos. A seguir, os frutos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 3 minutos, secos sob temperatura ambiente e divididos em grupos para a aplicação dos tratamentos (item 3.6).

### **3.2 Técnica de injúria mecânica**

O ferimento foi feito com o auxílio de um estilete com 3,0 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro, fixado sobre um suporte inoxidável (Figura 1 - anexo), em quatro locais equidistantes na região mediana do fruto, entre o pedúnculo e a base. Para o ensaio 4 (item 3.7.4) foi feita apenas uma injúria, também na região mediana do fruto.

### **3.3 Obtenção e preparo do inóculo de *Monilinia fructicola***

O inóculo, constituído por conídeos de *Monilinia fructicola*, foi obtido a partir de pêssegos infectados, adquiridos no comércio local. Com o auxílio de um bisturi, foi feita, assepticamente, a raspagem superficial dos esporos presentes nas áreas infectadas, sendo estes transferidos para placas de petri contendo meio BDA (200 g de batata (extrato), 20 g de dextrose, 18 g de ágar e 100 ml de água).

Após a incubação das placas à 20°C por 7 dias, realizou-se a repicagem, retirando-se fragmentos de BDA de regiões onde *Monilinia* se encontrava aparentemente isolada, sendo os esporos transferidos para outra placa contendo BDA.

Após a obtenção das culturas puras, estas foram então inoculadas em pêssegos sadios, a fim de se avaliar o potencial de desenvolvimento da infecção. A cultura pura foi conservada em placas de petri contendo BDA, à 4-5 °C.

A suspensão de esporos foi preparada apenas no momento da aplicação nos frutos, 48 horas após a instalação do experimento. Dez mililitros de água destilada e esterilizada foram colocados nas placas de petri sobre as colônias fúngicas de 8 dias de idade com o auxílio de um bisturi foi feita raspagem superficial sobre as colônias, obtendo-se uma suspensão. Foi adicionado, então, espalhante adesivo Tween 80 (1 gota/100 ml de amostra), a fim de possibilitar uma dispersão mais homogênea dos esporos. Através de diluições sucessivas e com a utilização de hemacitômetro, foi obtida uma suspensão de esporos com concentração de  $2 \times 10^6$  esporos/ml.

### 3.4 Cura de ferimento, inoculação e armazenamento dos frutos

Os frutos dos tratamentos 4 (FAI) e 5 (FCI) (frutos feridos tratados com água e cálcio respectivamente, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*) foram submetidos a um período de 48 horas de cura, sendo a seguir inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*.

Tanto a cura dos ferimentos quanto o armazenamento dos frutos foram feitos em recinto sob temperatura ambiente de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5\%$ .

A inoculação foi feita utilizando-se pipeta automática de 10  $\mu\text{l}$ , no ferimento dos frutos feridos e tratados com água e cálcio, respectivamente (FAI e FCI), após terem sido curados por 48 horas após a aplicação dos tratamentos.

### **3.5 Obtenção dos discos de tecidos dos pêssegos**

Os discos de tecidos dos pêssegos (epicarpo e mesocarpo) foram obtidos com auxílio de um perfurador de aço inoxidável com 0,8 cm de diâmetro (Figura 2 - anexo), tendo sido retirados ao redor dos ferimentos e nos frutos não feridos, em regiões similares àquelas dos ferimentos. Após a obtenção dos discos, sua profundidade foi padronizada em cerca de 3 mm, através de corte com auxílio de lâmina de aço inoxidável.

Imediatamente após a obtenção, os discos foram congelados em nitrogênio líquido e acondicionados em sacos plásticos, desaerados com auxílio de bomba a vácuo, selados hermeticamente e armazenados em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises.

### **3.6 Aplicação e descrição dos tratamentos**

A aplicação dos tratamentos foi realizada utilizando-se pipeta automática de 10  $\mu\text{l}$ , trocando-se as ponteiros de acordo com o tratamento utilizado: água,

cloreto de cálcio ou suspensão de esporos de *Monilinia fructicola*. Foram portanto, estabelecido os seguintes tratamentos:

- 1 - (SF): Frutos sem ferimento (controle): compreenderam os frutos submetidos apenas ao processo de desinfestação.
- 2 - (FA): Frutos feridos + água: compreenderam os frutos que foram feridos mecanicamente, e que receberam, subseqüentemente, no local do ferimento, a aplicação de água deionizada e autoclavada.
- 3 - (FC): Frutos feridos + cálcio: compreenderam os frutos que foram feridos mecanicamente, e que receberam, subseqüentemente, no local do ferimento, a aplicação de solução de cloreto de cálcio 1%, contendo 1% de tween 80, preparada com água deionizada e autoclavada.
- 4 - (FAI): Frutos feridos + água + inoculação fúngica: compreenderam os frutos que foram feridos e que receberam, subseqüentemente, o tratamento com água. Após o período de 48 horas de cura, foram inoculados, no local do ferimento, com uma suspensão de esporos de *Monilinia fructicola*.
- 5 - (FCI): Frutos feridos + cálcio + inoculação fúngica: compreenderam os frutos que foram feridos mecanicamente e que receberam, subseqüentemente, o tratamento com cálcio. Após o período de 48 horas de cura, foram inoculados no local de ferimento, com a suspensão de esporos de *Monilinia fructicola*.

### **3.7 Instalação dos ensaios**

#### **3.7.1 Ensaio 1: Caracterização dos frutos e perda de massa (umidade), por injúria mecânica, no armazenamento**

Foram utilizados frutos íntegros e as análises foram realizadas em 0, 4 e 8 dias após armazenamento em condições ambientais (item 3.4), para o acompanhamento das transformações com a evolução do grau de maturação. Os frutos foram avaliados quanto às seguintes características: massa, relação polpa/caroco, massa específica, diâmetro longitudinal e transversal, textura, aspecto visual, potencial hidrogeniônico (pH), sólidos solúveis (SS), acidez total titulável (ATT), relação SS/ATT. O ensaio seguiu um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 3 repetições, sendo a unidade experimental uma bandeja contendo 10 frutos.

Para a avaliação da perda de massa dos frutos (umidade), frutos dos tratamentos 2 e 3 (FA e FC) foram pesados até 96 horas de cura de ferimento, para a observação da perda de umidade em decorrência da injúria. Como controle foram utilizados frutos íntegros. O ensaio foi conduzido a nível de laboratório, em esquema fatorial (3 x 12) sendo: 3 tratamentos (SF, FA, FC) e 12 tempos de cura (0, 12, 24, 36, 48, 72, 84, 96, 108, 120, 132 e 144 horas); em DIC, com 3 repetições. A unidade experimental correspondeu a uma bandeja contendo 10 frutos.

### **3.7.2 Ensaio 2: Efeito do $\text{CaCl}_2$ na elicitação de respostas à cura de ferimentos**

As respostas dos tecidos, em decorrência da aplicação de  $\text{CaCl}_2$  no local do ferimento, foram avaliadas através de determinações enzimáticas e de parede celular.

Os discos de tecido dos frutos dos tratamentos 2 e 3 (FA e FC) foram avaliados quanto a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD), até 72 horas de cura dos ferimentos. O ensaio foi conduzido em esquema fatorial ( $3 \times 6$ ), sendo 3 tratamentos (SF, FA e FC) e 6 tempos de cura (0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas); em DIC, com 3 repetições. A unidade experimental correspondeu a uma bandeja contendo 10 frutos.

As transformações de parede celular foram detectadas através da análise de açúcares neutros, cálcio ligado, grau de esterificação das pectinas e lignina.

O ensaio foi realizado em esquema fatorial ( $3 \times 5$ ) sendo 3 tratamentos (SF, FA e FC) e 5 tempos de cura (0, 24, 48, 60 e 96 horas), e DIC, com 3 repetições. A unidade experimental correspondeu a uma bandeja contendo 10 frutos.

### **3.7.3 Ensaio 3: Efeito do $\text{CaCl}_2$ na elicitação de respostas de resistência à *Monilinia fructicola***

Os discos de tecidos dos frutos dos tratamentos 4 e 5 (FAI e FCI) foram avaliados quanto à atividade enzimática (FAL, POD, PFO) após 6, 12, 24 e 48

horas após a inoculação com suspensão de esporos de *Monilinia fructicola*. O ensaio foi conduzido em esquema fatorial (3 x 4), sendo 3 tratamentos (SF, FAI e FCI) e 4 tempos de cura (6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação do patógeno), em DIC, com 3 repetições. A unidade experimental correspondeu a uma bandeja contendo 10 frutos.

Os discos de tecidos dos frutos foram avaliados quanto aos componentes da parede celular (açúcares neutros, cálcio ligado, grau de esterificação das pectinas e lignina). O ensaio foi conduzido em esquema fatorial (2 x 3) sendo 2 tratamentos (FAI e FCI) e 3 tempos de cura (12, 24 e 48 horas após a inoculação do patógeno), em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 3 repetições. A unidade experimental correspondeu a uma bandeja contendo 10 frutos.

#### **3.7.4 Ensaio 4: Resistência dos tecidos ao desenvolvimento de lesões pela *Monilinea fructicola***

Os frutos dos tratamentos 1 (SF), 4 (FAI) e 5 (FCI), foram avaliados quanto ao desenvolvimento de infecção pela *Monilinia fructicola* as 24, 48 e 72 horas após a inoculação do patógeno. O ensaio foi conduzido em laboratório, em esquema fatorial (3 x 3), sendo 3 tratamentos (SF, FAI e FCI) e 3 tempos de cura (24, 48 e 72 horas após a inoculação do patógeno), em Delineamento Inteiramente Casualizado, com 4 repetições. A unidade experimental correspondeu a uma bandeja contendo 5 frutos. Nos frutos que apresentavam lesão pelo patógeno, foi avaliada a área lesionada e o grau de infecção, conforme metodologia descrita no item 3.12.

### **3.8. Avaliações físicas**

**3.8.1. Massa do fruto e do caroço (g):** obtido por gravimetria, utilizando-se balança semi-analítica.

**3.8.2 Relação Polpa/Caroço:** obtida dividindo-se a diferença entre o peso do fruto e o do caroço, pelo peso do caroço.

**3.8.3 Massa específica (g):** obtido dividindo-se o peso do fruto pelo volume de água deslocado em proveta graduada quando o fruto foi adicionado.

**3.8.4 Diâmetro longitudinal e transversal (cm):** obtido utilizando-se um paquímetro.

**3.8.5 Textura ( $1/\text{pol}^2$ ):** obtida utilizando-se um penetrômetro Magness Taylor, convertendo o valor em  $1/\text{pol}^2$  observado, para Newton pela multiplicação pela constante 4,11.

**3.8.6 Aspecto visual:** foi avaliado visualmente, levando-se em consideração a aparência externa da epiderme dos frutos

**3.8.7 Perda de massa:** obtida por gravimetria, utilizando-se balança semi-analítica.

### **3.9 Avaliações físico-químicas e química**

**3.9.1 pH:** obtido segundo a técnica do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), utilizando-se um potenciômetro de membrana de vidro.

**3.9.2 Acidez Total Titulável:** obtida segundo a técnica do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), expressa em porcentagem de ácido cítrico.

**3.9.3 Sólidos Solúveis:** obtidos segundo a técnica da AOAC (1992), utilizando-se refratômetro tipo Abbé.

**3.9.4 Relação Sólidos Solúveis : Acidez Total Titulável:** obtida dividindo-se os valores obtidos para os sólidos solúveis totais e a acidez total titulável.

### **3.10 Atividade enzimática**

#### **3.10.1 Fenilalanina amônia-liase (FAL)**

A atividade da FAL foi determinada com base na técnica preconizada por Hyodo e Yang, (1971) e por Hyodo, Kuroda & Yang, (1978), a partir da quantificação do ácido cinâmico formado.

A atividade enzimática foi expressa em UA.h<sup>-1</sup>, definida como a quantidade de FAL que produz um aumento de 0,01 unidade/hora na absorção à

290 nm. Esta mudança na absorção é equivalente à formação de 1  $\mu\text{M}$  de ácido cinâmico por  $\text{h}^{-1}$ .

### **3.10.2 Atividade da Polifenoloxidase (PFO) e Peroxidase (POD)**

A extração e a determinação da atividade da peroxidase (POD) e da polifenoloxidase (PFO) foram realizadas conforme metodologia preconizada por Flurkey e Jen (1978). A atividade enzimática foi expressa em  $\text{UA.h}^{-1}$ , definida como o conteúdo de enzima que produz aumento de 0,1 na absorção 0.1 DO por minuto, a 470 e 420 nm, respectivamente.

### **3.11 Análise da parede celular**

#### **3.11.1 Extração da parede celular**

A extração da parede celular foi realizada em discos de tecido de pêssegos, segundo a técnica descrita por Chitarra, Labavitch e Kader (1989). Foram utilizados 20 g do tecido do fruto, homogeneizado por 2 minutos em aparelho Tekmar, com igual quantidade de água gelada deionizada. O resíduo (fração insolúvel em água), após a lavagem com 60 ml de água gelada, foi liofilizado e triturado, representando o material da parede celular. Este foi posteriormente submetido ao processo de derivatização.

### **3.11.2 Açúcares neutros totais não celulósicos, teor de cálcio, grau de esterificação de pectinas e teor de lignina de parede celular**

O teor de açúcares neutros totais não celulósicos de parede celular foi obtido pelo método de Antrona (Southgate, 1991). Dois miligramas de material de parede foram inicialmente colocados em banho de gelo, sendo então submetidos a hidrólise com ácido sulfúrico 72% (3ml), com agitação intermitente. Foi utilizado 0,1 ml de amostra para o doseamento.

A fim de determinar os açúcares, após a obtenção do material de parede celular, foi realizada a derivatização (derivados alditol acetato) dos açúcares neutros, de acordo com a metodologia descrita por Albersheim et al. (1967), incluindo as etapas de hidrólise, redução e acetilação dos açúcares neutros.

Para a hidrólise, foram utilizadas 5mg de material de parede celular, acondicionadas em tubo de ensaio rosqueado com 0,5 ml de ácido trifluoroacético (TFA). O tubo foi aquecido a 121°C por uma hora em “block heater”. Em seguida o TFA foi evaporado, sendo adicionado 0,5 ml de metanol, que foi posteriormente evaporado.

Para a redução da parede celular, foi adicionado 0,15 ml de hidróxido de amônia 1N contendo borohidreto de sódio, na proporção de 10 mg de borohidreto de sódio para 1 ml de hidróxido de amônia 1,0 N (este reagente foi preparado na hora de sua utilização). Foram adicionadas então, algumas gotas de ácido acético p.a., sendo evaporados juntamente com a amônia. O próximo passo foi a adição de 0,5 ml de metanol e ácido acético (9:1), com posterior secagem, sendo este passo repetido por quatro vezes. Finalizando, adicionou-se 0,5 ml de metanol e este foi seco, repetindo-se esta etapa três vezes.

Para a acetilação, foram adicionados 0,15 ml de anidrido acético p.a. à amostra, cujo tubo foi selado e colocado a 121°C por três horas em “block heater”. Após a secagem do anidrido acético, 0,5 ml de metanol foram adicionados e seco. Este processo foi repetido por mais duas vezes.

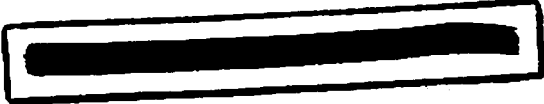
As amostras derivatizadas foram diluídas em 200 µL de acetona, tendo sido utilizado uma alíquota de 2 µL, que foi injetada em cromatógrafo à gás Intralab modelo 3300, com coluna capilar OV-DB 225, 0,25 mm de diâmetro interno e 25 m de comprimento, acoplado a um Integrador Intralab Mod 4290.

O hidrogênio foi utilizado como gás de queima, o ar sintético como mantenedor da chama, e o “make up”, uma mistura de hidrogênio e nitrogênio (30 ml.min<sup>-1</sup>). Foram utilizados a sensibilidade 11 e a atenuação 8, para a recepção dos impulsos elétrico. A pressão e fluxo da coluna, assim como o gás de arraste foram de 21 psi, 3,0 ml.min<sup>-1</sup> e 30 ml.min<sup>-1</sup>, respectivamente. Foram utilizadas as temperaturas de 210°C, 250°C e 300°C para a coluna, injetor e detector, respectivamente.

Como padrão, foi utilizado 1 g/l dos açúcares ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose, glicose.

O teor de cálcio ligado à parede celular foi determinado a partir da digestão nitroperclórica do material liofilizado de parede, sendo feito, posteriormente, a quantificação espectrofotométrica por absorção atômica (Sarruage e Haag, 1974). Os resultados foram expressos em gramas de cálcio em 100 gramas de parede celular de pêssego.

O grau de esterificação das pectinas foi determinado a partir da técnica descrita por Lurie et al. (1994). Foram utilizadas duas amostras de parede celular, sendo que na primeira, foi determinado o conteúdo de ácido galacturônico no material de parede celular após a incubação do mesmo em ácido sulfúrico 67%. Na outra amostra, foi feita a incubação com borohidreto de sódio, sendo



posteriormente neutralizada com ácido acético. A seguir, foi feita a evaporação do borohidreto e do ácido e uma posterior ressuspensão com ácido sulfúrico, sendo então realizada a quantificação colorimétrica do ácido galacturônico nas soluções sulfúricas. O grau de esterificação foi definido como a percentagem de ácido galacturônico esterificado em relação ao total.

Para a avaliação do teor de lignina associada à parede celular, inicialmente, foi obtida a fibra em detergente ácido (FDA) ou lignocelulose. A seguir, foi determinada a lignina segundo técnica de Van Soest, descrita por Silva (1981).

### **3.12 Avaliação da resistência dos tecidos a *Monilinia fructicola***

#### **3.12.1 Área lesionada**

Para a avaliação da área lesionada, o fruto foi posicionado de forma que o pedúnculo permanecesse verticalmente. A seguir, a área infectada foi medida a partir do centro do ferimento, medindo-se 4 raios em posição ortogonal nas superfícies: superior (S), inferior (I), direita (D) e esquerda (E), conforme esquematizado na Figura 3 (anexo). De posse dos raios S, I, D e E, estes foram somados, e então o valor obtido foi dividido por 4, obtendo-se, desta forma, um raio médio, que foi utilizado para o cálculo da área infectada. Em decorrência das áreas obtidas terem sido praticamente circulares, utilizou-se a fórmula padrão para cálculo da área do círculo, conforme descrito a seguir:

$$A = \pi.r^2, \text{ onde:}$$

**A** = área acometida pela infecção

**$\pi$**  = constante (3,1416)

**r** = raio médio  $[(\Sigma \text{ raios S, I, D, E})/4]$

A partir dos valores obtidos, foi determinado o índice de infecção.

### 3.12.2 Avaliação do índice de doença (ID)

Fazendo-se necessário um sistema consistente de avaliação do acometimento da infecção, e de posse das áreas previamente calculadas, conforme descrito no item 3.12.1, foram adotadas notas de 0 a 5, levando-se em consideração a frequência e a nitidez da área lesada, conforme os seguintes critérios:

**0-** ausência de infecção

**1-** infecção de área de  $0,04 \text{ cm}^2$

**2-** infecção de área de  $0,041$  até  $0,60 \text{ cm}^2$

**3-** infecção de área de  $0,61$  até  $3,00 \text{ cm}^2$

**4-** infecção de área de  $3,10$  até  $6,00 \text{ cm}^2$

**5-** infecção de área superior a  $6,00 \text{ cm}^2$

Em virtude dos tratamentos 1, 4 e 5 (SF, FAI e FCI) terem fornecido respostas bem distintas, foi utilizado o índice de doença (ID), descrito por Mc Kinney, citado por Cirulli e Alexander (1966), possibilitando, assim, uma avaliação qualitativa da resistência dos tecidos dos frutos de pessegueiro ao patógeno (*Monilinia fructicola*), de acordo com o tratamento utilizado:

$$ID = \frac{(f.v.)}{n.x} \times 100, \text{ onde:}$$

**ID** = índice de doença

**f** = número de frutos em cada categoria de infecção

**v** = grau de infecção

**n** = número total de frutos inoculados

**x** = grau máximo de infecção

### **3.13 Delineamento experimental e análise estatística**

Os ensaios foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), compondo um esquema fatorial. O número de repetições e a unidade experimental variou conforme o ensaio. De posse dos resultados, estes foram submetidos à análise de variância e às médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 1 e 5% de probabilidade, assim como às regressões entre o tempo de cura e às características avaliadas, tendo sido efetuadas utilizando-se o programa SANEST (Sistema de Análise Estatística), elaborado por Elio Paulo Zonta e Amauri Almeida Machado, do Instituto Agrônomo de Campinas. As regressões e as figuras foram efetuadas através do programa Sigma Plot 2.0 For Windows (Jandel Scientific, 1995).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização dos frutos e perda de massa..(umidade), por injúria mecânica, no armazenamento**

#### **4.1.1 Avaliações físicas**

A caracterização física de pêssegos da cv. Biuti, após a colheita e durante o armazenamento, encontra-se na Tabela 1 e a análise estatística no Quadro 1 (anexo).

Durante o período de armazenamento, observou-se uma redução estatisticamente significativa na massa dos frutos, comum em frutos armazenados, principalmente quando expostos à atmosfera ambiental, em decorrência de uma elevada taxa transpiratória e conseqüente perda de umidade (Kader, 1992).

**TABELA 1.** Características físicas do pêssego cv. Biuti proveniente de Santa Rita de Caldas - MG após a colheita e aos 4 e 8 dias de armazenamento a  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $90 \pm 5\%$

Determinações	Armazenamento			CV (%)
	(dias após a colheita)			
	0	4	8	
Massa do fruto (g)	104,20 A	94,20 AB	80,41 B	6,71
Massa do caroço (g)	6,88	6,83	6,90	5,15
Relação Polpa/Caroço	14,78	12,94	10,42	6,42
Diâmetro (cm) transversal	5,66	5,48	5,43	4,95
Diâmetro (cm) longitudinal	6,00 A	5,73 AB	5,33 B	3,89
Textura (N)	86,48 A	80,98 B	68,93 C	4,21

(1) Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A massa do caroço, bem como a relação polpa/caroço, não apresentaram variação significativa, apesar de ter sido evidenciada uma tendência para o declínio, nesta última, durante o armazenamento.

Segundo Gangwar e Tripathilt (1972), a relação polpa caroço tende a diminuir com o amadurecimento, sendo um bom indicativo do coeficiente para a determinação do tempo de amadurecimento do fruto.

Em trabalho realizado com pêssegos, também da cv Biuti, armazenados por 7 dias a  $20^{\circ}\text{C}$  e 75 - 80% de umidade relativa, foram obtidos, ao final do armazenamento, valores de massa do fruto, do caroço, assim como da relação polpa/caroço, reduções de 14,68 %, 4,30 % e 13,40 % respectivamente (Moraes, 1992). A redução na relação polpa caroço apresentou valores bem próximos à

obtida no presente estudo, ao passo que a perda de massa do fruto apresentou-se superior (22,83 %), não havendo perda de massa do caroço.

Com relação aos diâmetros transversal e longitudinal dos frutos, estes apresentaram uma redução de cerca de 4,06 e 11,17%, respectivamente, entre a colheita (tempo 0) e o armazenamento por 8 dias. Reduções menores às do que as observadas por Moraes (1992) de 9,17% e 11,83% nos diâmetros transversal e longitudinal, respectivamente.

A menor redução da relação polpa/caroço, assim como dos diâmetros transversal e longitudinal, constatada no presente estudo, quando comparada a obtida por Moraes (1992) foi, possivelmente, decorrente da maior umidade relativa utilizada na atmosfera de armazenamento, reduzindo assim, a desidratação dos tecidos, e por conseguinte, o murchamento.

Por outro lado, quando pêssegos da cultivar Biuti foram armazenados a 0°C, 90 - 95% de UR, sob atmosfera modificada, durante o período de 40 dias, evidenciou-se que os diâmetros longitudinal e transversal permaneceram praticamente constantes, apresentando valores compreendidos entre 5,43 e 5,61 cm; 5,54 e 5,91 cm, respectivamente (Holland, 1993). Estes valores estão na faixa daqueles observados no presente trabalho, após a colheita dos frutos, denotando assim o efeito da atmosfera modificada na manutenção de elevados níveis de umidade da polpa, quando comparados aos níveis apresentados pelos frutos armazenados em atmosfera ambiente.

A textura foi caracterizada por um amaciamento gradual durante o período de armazenamento.

Em trabalhos realizados por Tourino (1990); Moraes (1992) e Holland (1993) em pêssegos da cv Biuti, os frutos apresentaram, no ponto de maturidade comercial, textura de 90,75; 79,40 e 85,98 N, respectivamente. Portanto, os

valores de textura obtidos neste estudo se encontram na faixa mencionada pela literatura.

Entretanto, após 8 dias de armazenamento, em decorrência do amaciamento dos frutos, a textura atingiu 68,93 N, um valor um pouco inferior ao obtido por Moraes (1992) 73,84 N, todavia justificável pelo menor período de armazenamento dos frutos (realizado em apenas 7 dias).

Segundo Chitarra e Chitarra (1990), a decomposição de moléculas poliméricas como protopectinas, celulosas e hemicelulosas amaciam as paredes celulares, uma vez que diminuem a força coesiva que mantêm as células unidas. Portanto, o amaciamento dos tecidos de frutos está associado com às mudanças no grau de polimerização e na composição dos açúcares de parede celular, resultando em alterações na sua estrutura, e conseqüentemente, em decréscimo na coesão dos tecidos (Fisher, Arrigoni e Amado, 1994).

O armazenamento alterou, também, a aparência dos pêssegos em estudo. Mesmo em recinto com umidade relativa elevada, após 8 dias de armazenamento, observou-se enrugamento acentuado do epicarpo e textura elástica, decorrentes da perda de umidade (desidratação).

A avaliação da aparência externa de frutos armazenados a atmosfera ambiente, é extremamente útil na estimativa do limite de tempo de comercialização dos mesmos.

Observou-se que o tempo de vida útil pós-colheita de 4 dias foi o ideal para a manutenção dos frutos com boas características físicas, para a utilização nos ensaios subseqüentes do presente trabalho.

#### 4.1.1.2 Perda de massa (umidade dos frutos) (ensaio 1)

As médias correspondentes à perda de massa (%) de pêssegos, durante o período de 144 horas de armazenamento encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2. Valores médios da perda de massa (%) de pêssegos, submetidos aos tratamentos SF\*, FA\*\* e FC\*\*\*, durante o período de 144 horas de armazenamento, a uma temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5\%$

Armazenamento (horas)	Perda de massa (%) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FA <sup>1</sup>	FC
12	1,68 kA	1,80 jA	1,80 iA
24	4,20 jA	4,48 iA	4,73 hA
36	5,72 ijA	5,87 hiA	6,15 ghA
48	7,49 hiA	7,38 ghA	7,72 fgA
60	9,63 ghA	9,28 gA	10,03 fA
72	1,87 fgA	12,24 fA	13,03 eA
84	13,86 efA	14,24 efA	15,22 deA
96	15,86 deA	16,48 deA	17,51 cdA
108	18,03 cdA	18,55 cdA	19,66 bcA
120	19,99 bcA	20,63 bcA	21,48 bA
132	22,28 abB	23,00 abAB	24,30 aA
144	24,55 <sup>a</sup> B	25,94 aA	26,23 aA

CV (%) = 7,85

\*SF (frutos sem fermento).

\*\*FA (frutos feridos e tratados com água).

\*\*\*FC (frutos feridos e tratados com cálcio).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que os fatores tempo e tratamento foram significativos (Quadro 2 - anexo).

Durante o período de 144 horas de armazenamento, ocorreu uma perda gradual da massa dos frutos em todos os tratamentos. Às 144 horas, os tratamentos com água ou cálcio apresentaram perdas de massa estatisticamente semelhantes, sendo porém, superiores as dos frutos controle.

Pôde-se verificar que, apenas a partir das 132 horas de armazenamento, os ferimentos passaram a contribuir para uma maior perda de massa pelos frutos tratados com cálcio, em relação aos frutos controle. Todavia, neste período, o aspecto visual dos frutos já não os tornava aceitáveis para o consumo. Desta forma, aparentemente, a perda de massa até 120 horas de armazenamento foi determinada pela superfície dos frutos, independentemente dos ferimentos.

A desidratação de frutos é indesejável sob vários aspectos. Os produtos suculentos apresentam alto conteúdo de umidade por ocasião da colheita. Assim, a perda da umidade, mesmo que relativamente baixa, poderia apresentar sérios efeitos sobre as propriedades físicas, fisiológicas, patológicas, nutricionais, econômicas e estéticas do produto (Pantastico, 1975). Segundo o autor, uma perda máxima permissível para um grande número de frutos e hortaliças, estaria numa faixa entre 3,7% para alface (*Lactuca sativa* L.) e 41% em feijão (*Phaseolus vulgaris*).

Em uvas, a perda de 5% de peso é suficiente para que as mesmas apresentem sintomas como murchamento e perda de firmeza ), sendo considerados não comerciáveis, frutos com perda de peso de 7 a 12% (Perkin, 1992). Em laranjas, por outro lado, é tolerada uma perda de peso de até 12% (Pantastico, 1975).

A desidratação de frutos apresenta graus de grandeza que são dependentes de fatores como: temperatura, umidade relativa, assim como da utilização de recursos que ofereçam uma barreira a perda de água.

Em experimento realizado com pêssegos da cultivar Biuti, em atmosfera modificada, a uma temperatura de  $0 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e uma umidade relativa de 90-95%, foi constatada uma perda de peso de 1,58% nos 20 primeiros dias de armazenamento (Holland, 1993). Por outro lado, quando pêssegos das cultivares Delícia e Talismã foram armazenados em câmara fria a  $0^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de 85-90% por 5 semanas, constatou-se uma desidratação de 30 e 27%, respectivamente, quando os mesmos foram retirados da câmara e expostos por 18 horas a  $21^{\circ}\text{C}$  (Ballod, 1990).

A maior perda de massa ocorrida no presente estudo, em comparação aos frutos armazenados sob refrigeração (Holland, 1993), foi decorrente das condições atmosféricas utilizadas, o que contribuiu para o aumento da transpiração e da atividade metabólica dos frutos.

Muitos autores correlacionam a resistência de determinados frutos a certos fungos patogênicos, com a desidratação dos tecidos, uma vez que a desidratação, dificulta o fornecimento de umidade suficiente para a germinação dos esporos, podendo acarretar na morte dos mesmos. Todavia, no presente estudo, esta correlação não foi observada.

#### 4.1.2 Avaliações físico-químicas e química

Os valores médios dos componentes físico-químicos e químico do pêssego, cv. Biuti, encontram-se na Tabela 3, e a análise estatística no Quadro 3 (anexo).

Os valores de pH apresentaram aumento significativo durante o armazenamento. De acordo com Lehninger (1976) e Conn e Stumpf (1980), a acidez e o pH dos frutos se relacionam, aparentemente, com a capacidade tamponante da polpa dos frutos, assegurando uma certa estabilidade da mesma, apesar das variações ocorridas no conteúdo de ácido cítrico durante o armazenamento dos frutos.

Os valores obtidos no presente estudo foram maiores do que aqueles observados por Moraes (1992), em pêssegos da mesma cultivar, armazenados por 7 dias a 20°C e umidade relativa de 75 a 80%, cujos valores estiveram compreendidos entre 3,5 (após a colheita) e 3,4 (aos 7 dias de armazenamento). Possivelmente; esta diferença de pH seja decorrente das variações edafoclimáticas ou do grau de maturação dos frutos à colheita.

TABELA 3. Valores médios dos componentes físico-químicos e químico do pêssego cv. Biuti proveniente da região de Santa Rita de Caldas - MG, após a colheita e aos 4 e 8 dias de armazenamento a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $90 \pm 5\%$  <sup>1</sup>

Determinações	Armazenamento			
	(dias após a colheita)			
	0	4	8	CV (%)
pH	3,66 B	3,68 AB	3,87 A	3,05
Sólidos Solúveis (SS) (%)	12,07	12,43	12,57	1,81
Acidez Total Titulável (ATT) (% de ácido cítrico)	0,95 A	0,92 A	0,77 B	6,59
SS/ATT	15,61	13,53	13,32	8,18

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de sólidos solúveis (SS) foi em média de 12,36%, tendo sido observada uma pequena tendência para o aumento, ao longo do período de armazenamento, em decorrência da perda de umidade dos frutos. Segundo Coelho (1994), com o avanço da maturação, há decréscimo na acidez total titulável, associado a um aumento no conteúdo de sólidos solúveis totais.

Tanto os valores obtidos para os SS quanto para a ATT, estão na faixa dos obtidos por Moraes (1992), também em pêssegos da cv Biuti, armazenados a 20°C e 75-80% de UR, por 7 dias.

A relação SS/ATT é utilizada em muitos frutos para se avaliar o estágio de amadurecimento, uma vez que este quociente determina o "flavor" do fruto. Em decorrência de apresentar alguns constituintes voláteis, a relação entre os SS e a ATT é mais indicativa do sabor, uma vez que quando se estabelece essa relação, avalia-se a acidez titulável e não a acidez total (Holland, 1993).

No presente estudo, a relação SS/ATT foi de 12,70, alcançando após 4 e 8 dias de armazenamento, valores de 13,51 e 16,32, respectivamente, próximo a 15, citado por Claypool (1959), como "ideal" para pêssegos.

## **4.2 Efeito do cloreto de cálcio na elicitação de respostas à cura de fermento (ensaio 2)**

### **4.2.1 Atividade enzimática**

#### **4.2.1.1 Fenilalanina amônia-liase (FAL)**

As médias correspondentes à atividade da enzima FAL de pêssegos, durante 72 horas de cura, encontram-se na Tabela 4.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que os fatores tempo, tratamento, assim como a interação tempo x tratamento foram significativos (Quadro 4 - anexo).

Constatou-se a tendência de aumento da atividade da FAL até 24 horas de cura do ferimento, no tratamento FA e até 36 no FC, enquanto que no controle (SF) houve tendência ao declínio com o tempo de armazenamento dos frutos.

**TABELA 4.** Valores médios da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase ( $\text{UAE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido fresco), de discos de tecidos de pêssegos, submetidos aos tratamentos SF<sup>\*</sup>, FA<sup>\*\*</sup> e FC<sup>\*\*\*</sup>, durante o período de 72 horas de cura, à  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5\%$ , durante 72 horas de cura

Tempo de cura (horas após a aplicação dos tratamentos)	Atividade da enzima FAL ( $\text{UAE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}$ de tecido fresco) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FA	FC
0	79,61 aA	76,19 cB	77,66 cABC
12	77,46 aB	83,82 bA	75,53 cB
24	79,88 aC	94,39 aA	89,13 bB
36	76,55 aB	74,40 cB	97,57 aA
48	56,92 bB	68,05 dA	42,01 eC
72	37,77 cB	50,94 eA	48,06 dA

CV (%) = 3,30

<sup>\*</sup>SF (frutos sem ferimento).

<sup>\*\*</sup>FA (frutos feridos e tratados com água).

<sup>\*\*\*</sup>FC (frutos feridos e tratados com cálcio).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em pêssegos, também da cultivar Biuti, injuriados mecanicamente, Tourino verificou aumento da atividade da FAL entre 0 e 48 horas de cura, de 83,89 a 107,26 (UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de tecido), comparados aos frutos controle sem ferimento, cuja atividade da FAL foi de 85,06 a 80,77.

No presente estudo, os resultados apresentaram a mesma tendência daqueles obtidos por Tourino (1990), apesar da atividade da FAL ter se apresentado um pouco menor.

Segundo Joslyn e Ponting (1951), fatores como maturidade, estágio de desenvolvimento, clima e nutrição mineral atuam diretamente no nível de fenólicos em frutos, o que poderia justificar as diferenças na atividade da FAL observada.

Tendência de comportamento semelhante foi obtido, também, em mangas, na injúria causada pela desordem fisiológica tipo tecido esponjoso. A atividade da FAL, foi de cerca de 40 UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de tecido, atingindo valores em torno de 60 UAE.min. g<sup>-1</sup> de tecido, aos 28 dias de armazenamento a 12 ± 2°C e 75% de UR (Lima, 1997).

No que diz respeito à constatação de que, nos frutos feridos e tratados com cálcio, o pico de atividade da FAL ocorreu posterior aos frutos feridos e tratados com água, pode-se supor que o cálcio tenha atuado diretamente a nível de membrana celular e parede celular.

O cálcio atua na proteção da integridade da membrana, estabilizando e controlando as funções a ela associadas. Na parede celular, o cálcio forma pontes iônicas dentro e entre os polímeros pécticos, conferindo, desta forma, rigidez às paredes celulares (Poovaiah, Glenn e Reddy, 1988).

Possivelmente, o cálcio tenha se associado a parede celular e a membrana plasmática, conferindo uma certa estabilidade, o que retardou o contato enzima-substrato e, conseqüentemente, o pico de atividade da FAL.

Segundo **Bowell et al. (1991)**, o incremento da atividade da FAL tem sido apontado por ser um indicador de elicitação. O elicitor induz a síntese “de novo” da enzima, responsável pela catálise do passo regulatório chave da biossíntese de compostos fenólicos. O incremento da atividade da FAL dependente de elicitor, é precedido pelo aumento da transcrição de alguns genes da enzima.

**Brown, Ismail e Balmore (1978)** verificaram que pequenas variações na temperatura ou umidade são suficientes para impedir o processo de lignificação, tendo sido constatado que uma pequena elevação na temperatura de 30°C (temperatura ótima) para 33°C foi suficiente para causar um efeito inibitório sobre o processo de síntese de lignina em citrus.

Portanto, no presente estudo, aparentemente, a temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $90 \pm 5\%$ , utilizados durante a cura de ferimento, tenha sido uma condição ambiental favorável para sua atividade em contrapartida, por exemplo, à temperatura de 20°C e umidade relativa de 70% utilizadas por **Moraes (1992)**, também em pêssegos, onde não foi evidenciado a síntese de lignina.

#### **4.2.1.2 Polifenoloxidase (PFO)**

As médias correspondentes à atividade da enzima PFO, de pêssegos, durante 72 horas de cura, encontram-se na Tabela 5.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que os fatores tempo, tratamentos, assim com a interação tempo x tratamentos, foram significativos (Quadro 4 - anexo).

Os frutos feridos e tratados com água (FA) e cálcio (FC), apresentaram aumento da atividade da PFO até 48 horas de cura do ferimento, decrescendo a

seguir. O tratamento com o cálcio induziu o aumento da atividade com valores estatisticamente superiores aos da água, até 12 horas de cura do ferimento, sendo, porém, superados por estes a partir de 24 horas após a aplicação dos tratamentos. A atividade da PFO nos frutos controle, apresentou pequeno declínio apenas após 48 horas de armazenamento.

TABELA 5. Valores médios da atividade da enzima polifenoloxidase (UAE.min<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup> de tecido fresco), em discos de tecidos de pêssegos, submetidos aos tratamentos SF<sup>\*</sup>, FA<sup>\*\*</sup> e FC<sup>\*\*\*</sup>, durante o período de 72 horas de cura, à 25 ± 3°C e umidade relativa do ar de 90 ± 5%, durante 72 horas de cura.

Tempo de cura (horas após a aplicação do tratamento)	Atividade da PFO (UAE.min <sup>-1</sup> g de tecido fresco) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FA	FC
0	27,68 abB	28,51 eB	33,08 eA
12	28,49 aB	30,56 eB	34,44 eA
24	28,50 aC	40,78 dA	37,19 dB
36	27,78 abC	49,41 cA	38,82 cB
48	26,24 abC	77,38 aA	57,28 aB
72	25,81 bC	65,77 bA	47,14 bB

cv (%) = 2,63

\*SF (frutos sem ferimento).

\*\*FA (frutos feridos e tratados com água).

\*\*\*FC (frutos feridos e tratados com cálcio).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O aumento na atividade da PFO nos pêssegos, quando submetidos a injúria mecânica e/ou a aplicação de cálcio, pode ser decorrente do fato de que, sendo a PFO uma proteína de membrana, é ativada tanto pela sua ruptura, quanto pelo ataque de enzimas proteolíticas, conforme relatado por Sanchez-Ferrer, Bru e Garcia-Carmona (1989).

Resultados semelhantes foram obtidos por Luh e Phithakpol (1972), os quais verificaram que, quando tecidos de pêssegos foram mecanicamente feridos, após a colheita ou durante o processamento, a PFO era ativada, catalisando a oxidação de compostos fenólicos, com conseqüente formação de pigmentos de coloração escurecida, as quinonas.

No presente estudo, observou-se que a atividade da PFO foi inferior no tratamento onde os frutos, após terem sido feridos, receberam cálcio (FC), em relação aos frutos feridos e tratados com água (FA), sendo provavelmente, devido ao efeito do cálcio na estabilização das membranas, conforme relatado por Marinos (1962), em estudos realizados com auxílio de microscopia eletrônica.

Jones e Lunt (1967) também verificaram que o rompimento de uma célula era grandemente afetado pela concentração de cálcio circundante, tendo sido observado que, quando o cálcio era adicionado, a membranas desorganizadas, estas se reestabeleciam.

O cálcio também está associado à parede celular, uma vez que se combina com os grupos carboxílicos do ácido péctico, dando origem a pectatos de cálcio que, juntamente com os pectatos de magnésio, constituem a lamela média de parede celular, responsável pela ligação de células adjacentes (Mascarenhas, 1977).

Desta forma, o cálcio aplicado, possivelmente, tenha se ligado aos fosfolípídeos presentes na membrana plasmática, atuando no restabelecimento da membrana (Jones e Lunt, 1967). Paralelamente, na parede celular, poderia ter se

associado aos grupamentos carboxílicos das pectinas (Mascarenhas, 1977), conferindo assim, maior estabilidade da célula e portanto, menor ativação da PFO (Sanchez-Ferrer, Bru e Garcia-Carmona, 1989).

#### 4.2.1.3 Peroxidase (POD)

As médias correspondentes à atividade da enzima POD de pêssegos durante o período de 72 horas de cura encontram-se na Tabela 6.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que os fatores tempo, tratamento, assim com a interação tempo x tratamento foram significativos (Quadro 4 - anexo).

A análise das médias dos tratamentos, indicou que, de modo semelhante ao observado para a PFO, houve aumento de atividade da POD nos tratamentos FA e FC até 48 horas de cura, com posterior decréscimo. Os frutos tratados com cálcio apresentaram, a partir de 36 horas de cura, menor atividade da POD, quando comparados aos frutos tratados com água. Nos frutos controle, não houve aumento da atividade.

Segundo a literatura, a peroxidase em pêssegos se encontra associada à parede celular, ao plasmalema e ao tonoplasto, podendo também estar presente nos vacúolos ou solubilizada nos espaços intercelulares (Mader, 1976). Portanto, o aumento da atividade da POD evidenciado nos tratamentos FA e FC, provavelmente é decorrente da própria lesão causada pelo ferimento, que indubitavelmente, levou à ruptura da parede celular, do plasmalema e do tonoplasto, acarretando a descompartimentalização do vacúolo e conseqüente ativação de peroxidases aniônicas, conforme observado por Lagrimini (1991), em

estudo realizado com 507 tipos de plantas, cujos tecidos foram submetidas a injúria mecânica.

TABELA 6. Valores médios da atividade da enzima peroxidase (UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de tecido fresco), observados em discos de pêssegos, submetidos aos tratamentos SF\*, FA\*\* e FC\*\*\*, durante o período de 72 horas de cura, a uma temperatura de 25 ± 3°C e umidade relativa do ar de 90 ± 5%

Tempo de cura (horas após a aplicação do tratamento)	Atividade da POD (UAE.min <sup>-1</sup> . g de tecido fresco) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FA	FC
0	11,91 aA	11,95 dA	11,90 cA
12	12,58 aA	13,29 dA	12,60 cA
24	12,68 aA	14,42 dA	13,51 cA
36	13,05 aC	25,30 bA	20,82 bB
48	12,58 aC	29,63 aA	23,71 aB
72	12,37 aC	22,53 cA	19,82 bB

CV (%) = 6,81

\*SF (frutos sem fermento).

\*\*FA (frutos feridos e tratados com água).

\*\*\*FC (frutos feridos e tratados com cálcio).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Com o estudo das enzimas envolvidas na síntese dos fenilpropanóides; FAL, POD e PFO, pôde-se observar o efeito do cálcio na redução da atividade das mesmas.

De posse das informações acerca da importância do cálcio, não apenas na fixação de poliuronídeos à lamela média, mas também nas ligações coordenadas do íon com grupamentos hidrolítico de diferentes polissacarídeos presentes na parede celular (Wuytack e Gillet, 1978), associadas às evidências acerca da capacidade de membranas altamente desorganizadas se restabeleceram diante da adição de cálcio. Pode-se supor que a incorporação do cálcio aplicado ao ferimento, possivelmente tenha atuado na reorganização das membranas celulares, retardando assim, o acesso das enzimas aos seus respectivos substratos, e portanto a sua atividade.

#### **4.2.2 Análise de parede celular**

##### **4.2.2.1 Composição em açúcares neutros não celulósicos**

Os teores de açúcares neutros não celulósicos de parede celular presentes nos tratamentos SF, FA e FC foram apresentados na Tabela 7, Figura 1.

Através da análise estatística ( $p < 0,01$ ), foi evidenciado que o fator tempo foi significativo para todos os açúcares (Quadro 5).

O fator tratamento foi significativo ( $p < 0,01$ ) apenas para a arabinose, galactose e glicose, ao passo que a interação tempo x tratamento foi significativo ( $p < 0,01$ ) para a galactose e glicose (Quadro 5 - anexo).

TABELA 7. Valores médios dos teores de açúcares neutros não celulósicos (mg/100 mg de parede celular) presentes na parede celular de pêssegos submetidos aos tratamentos SF<sup>\*</sup>, FA<sup>\*\*</sup> e FC<sup>\*\*\*</sup>, respectivamente, durante o período de 96 horas de cura a uma temperatura de 25 ± 3°C e umidade relativa do ar de 90 ± 5%

Teores de açúcares neutros não celulósicos (mg/100 mg de parede celular)	Tempo (horas após a aplicação dos tratamentos)				
	0	24	48	60	96
	Tratamento <sup>1</sup>				
	SF <sup>*</sup>				
Ramnose	0,6 AB	0,29 dA	0,47 cB	0,30 dA	0,83 aA
Fucose	0,33 a	0 b	0 b	0 b	0 b
Arabinose	8,53 bA	11,49aA	11,29 <sup>b</sup> aA	11,12 abA	9,4 abA
Xilose	2,03 bA	2,77 aA	2,67 aA	1,37 cB	0 dA
Manose	1,26 cA	1,18 cB	1,73 cB	3,60 bB	6,37 aAB
Galactose	3,05cA	2,23 cA	0,16 cB	2,71 bB	0,41 aC
Glicose	4,04 cA	4,29 cA	5,87 bA	6,14 bB	10,97 aA
	FA <sup>**</sup>				
Ramnose	0,61 bB	0,28cA	0,36 cB	0,36 cA	0,96 aA
Fucose	0,33 a	0 b	0,01 b	0 b	0,08 b
Arabinose	7,72 bA	11,59 aA	12,74 aA	11,8 aAB	10,76 aA
Xilose	1,93 cA	2,59 abA	3,10 aA	2,20 bcA	0 b
Manose	1,08 cA	2,88 bA	1,84 cB	1,75 cC	6,68 aA
Galactose	2,85 aA	2,29 aA	0,16 aB	2,79 aB	2,09 aA
Glicose	3,83 bA	4,35 bA	6,13 bA	6,69bAB	11,02 aA
	FC <sup>***</sup>				
Ramnose	0,75 aA	0,31 bA	0,74 aA	0,42 bA	0,68 aB
Fucose	0,31 a	6,02 b	0,01 b	0,12 b	0,07 b
Arabinose	9,41 cA	12,7 abA	13,46 bA	14,51 aB	11,17 bcA
Xilose	2,32 aA	2,71 aA	2,74 aA	2,47 aA	0 bA
Manose	1,21 cA	3,09 bA	5,59 aA	4,91 aA	5,6 aB
Galactose	3,11 cA	3,10 cA	3,93 cA	14,49 bA	17,9 aB
Glicose	5,12 dA	4,07 cdA	6,68 bcA	8,13bA	11,37 aA

<sup>\*</sup> SF (frutos sem fermento).

<sup>\*\*</sup> FA (frutos feridos e tratados com água).

<sup>\*\*\*</sup> FC (frutos feridos e tratados com cálcio).

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

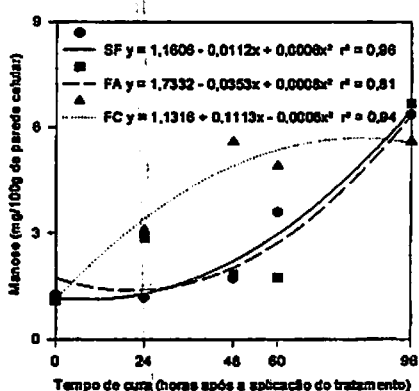
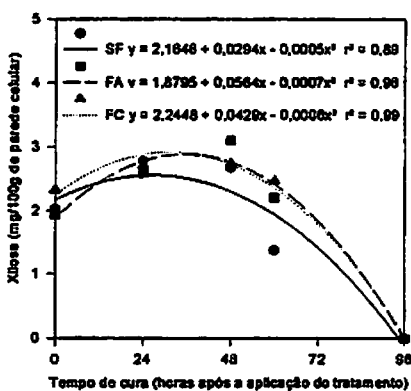
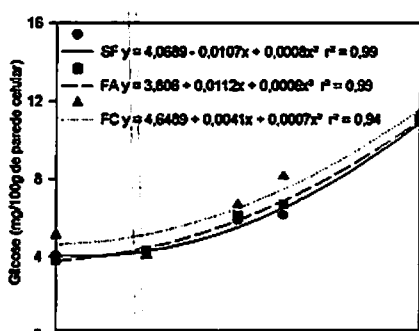
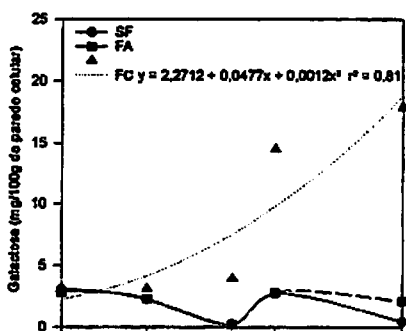
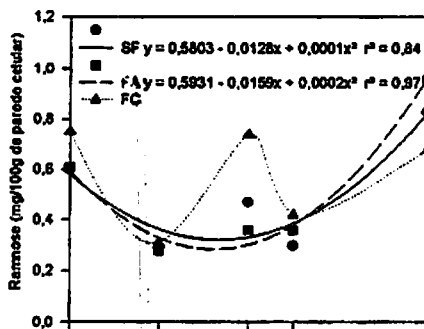
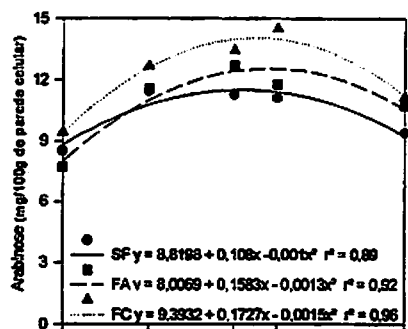


FIGURA 4. Açúcares neutros não celulósicos (mg/100g de parede celular) presentes na parede celular de pêssegos submetidos aos tratamentos SF (frutos sem fermento), FA e FC (frutos feridos e tratados com água e cálcio, respectivamente), durante o período de 96 horas de cura uma temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5\%$ .

Durante as 96 horas de cura, ocorreu uma grande variação no conteúdo dos açúcares presentes na parede celular de discos de pêssegos, submetidos aos tratamentos SF, FA e FC, o que foi, possivelmente, decorrente da alta taxa de “turnover” destes compostos. Labavitch (1981) sugere que os compostos de parede celular podem estar sendo degradados, enquanto a síntese e deposição de compostos iguais ou similares podem estar ocorrendo concomitantemente.

Os açúcares predominantes foram a arabinose, seguida pela glicose e pela galactose.

A galactose aumentou consideravelmente no tratamento com cálcio a partir de 60 horas de cura. No entanto, o teor apresentado pelos frutos do tratamento FA foi superior ao FC às 96 horas de cura.

A glicose e a arabinose apresentaram um aumento constante com o tempo de cura, com valores ligeiramente superiores nos frutos tratados com cálcio.

O conteúdo de manose apresentou aumento no tratamento FC a partir de 48 horas, havendo aumento e equivalência nos valores dos três tratamentos, as 96 horas de cura.

A ramnose apresentou baixos teores em todos os tratamentos com pequeno aumento apenas após 60 horas de cura.

A redução no conteúdo de ramnose, em tomate, foi sugerida por Filgueiras (1996), como sendo indicativo da linearização das cadeias principais, em decorrência dos resíduos de ramnose introduzem “pontos de quebra” na conformação das cadeias.

Mangas et al. (1992) relataram que as regiões de ramificações dos polissacarídeos de parede celular possibilitaram ligações entre a pectina e a hemicelulose, sendo o aumento da proporção de ramnogalacturonanas mais ramificadas, indicativo de que a parede celular estaria mais preservada.

Portanto, seria esperado que nos frutos controle (SF), a linearização das cadeias principais fosse menos acentuada do que nos frutos FA e FC, em virtude dos frutos não terem sofrido nenhum tipo de injúria, estando as paredes celulares primárias mais íntegras e com o maior conteúdo de ramnose em relação aos demais tratamentos.

Todavia não houve uma diferenciação distinta entre as respostas dos frutos controle e dos tratamentos sujeitos ao ferimento mecânico, tendo inclusive sido evidenciado nos tempos 0, 48 e 60 horas, após a aplicação dos tratamentos, os maiores conteúdos de ramnose, encontrados no tratamento FC.

Possivelmente tenha sido devido à presença de cálcio no meio, o que favoreceu uma maior taxa de "turnover" da ramnose, e conseqüente introdução maior de regiões de "pontos de quebra" e portanto, uma recuperação maior da parede celular primária (Mangas et al., 1992). Isto acarretou numa maior estabilidade e rigidez à parede celular, e portanto, menor susceptibilidade ao ataque fúngico, conforme evidenciado no item 4.4.1.

Hedge e Maness (1996) em estudo realizado na parede celular de pêssegos, verificaram a presença de uma percentagem considerável de resíduos galacturonosil, arabinosil, galactosil e xilosil, assim como aumento considerável nos resíduos de arabinosil e uma redução insignificante nos resíduos de galacturonosil durante o amaciamento de frutos.

Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, no que diz respeito ao aumento dos resíduos de arabinose, sendo este superior no tratamento com cálcio, em relação ao tratamento com água, que por sua vez, foi superior aos frutos controle. Possivelmente o cálcio tenha sido o responsável por esta variação ocorrida no teor de galactose.

Por outro lado, Moraes (1992), em trabalho realizado com pêssegos da cv. Biuti, submetidos a injúria mecânica e armazenados a 20°C e 75-80% de UR,

verificou aumento no conteúdo de galactose, tanto em frutos feridos, quanto nos não feridos.

Com relação à glicose, os teores encontrados foram muito elevados, semelhantemente aos obtidos por Holland (1993) também em pêssegos, que foram atribuídos à presença de resíduos de celulose nas amostras. Estes, após a hidrólise, possivelmente contribuíram para os altos teores de glicose detectados. Outra possibilidade sugerida por Filgueiras (1996) para explicar os altos teores de glicose foi a presença de amido nas amostras, em decorrência da metodologia de extração utilizada.

#### **4.2.2.2 Açúcares neutros totais não celulósicos**

O teor médio de açúcares neutros totais não celulósicos de parede celular (mg/g) foram apresentados na Tabela 8.

Através da análise estatística ( $p < 0,01$ ) foi evidenciado que os fatores tempo, tratamento, assim com a interação tempo x tratamento foram significativos (Quadro 6 - anexo).

O teor de açúcares neutros totais de parede celular diferiu entre os tratamentos SF, FA e FC, com oscilações durante o período de cura. É possível que esta variação tenha sido decorrente da alta taxa de “turnover”, uma vez que ocorrem concomitantemente degeneração, síntese e deposição de açúcares (Labavitch, 1981).

Os frutos feridos tratados com cálcio apresentaram maior teor de açúcares neutros totais em relação àqueles feridos e tratados com água, tendo sido, provavelmente, decorrente da capacidade do cálcio de elicitar a síntese de

açúcares neutros de parede celular, a fim de repor os tecidos dos pêssegos lesados pelo ferimento.

TABELA 8. Valores médios do teor de açúcares neutros totais não celulósicos ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido liofilizado de parede celular) presentes em discos de tecidos de pêssegos, submetidos aos tratamentos SF\*, FA\*\* e FC\*\*\*, durante o período de 96 horas de cura, a uma temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5\%$

Tempo de cura (horas após a aplicação do tratamento)	Teor de açúcares neutros totais ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de tecido liofilizado de parede celular) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FA	FC
	0	262,00 cdA	289,91 bcA
24	226,71 dB	320,43 abA	318,70 cA
48	365,74 aA	273,03 cB	379,52 abA
60	318,85 bC	353,86 aB	393,16 aA
96	292,68 bB	289,31 bcB	345,65 bcA

CV (%) = 4,65

\* SF (frutos sem ferimento).

\*\* FA (frutos feridos e tratados com água).

\*\*\* FC (frutos feridos e tratados com cálcio).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Felle (1988) relatou a importância dos níveis de cálcio citoplasmático na mediação de processos fisiológicos de plantas, destacando-se dentre eles, a indução de respostas de defesa de tecidos vegetais a injúrias.

Ao cálcio foi atribuído o papel de atuar como molécula sinalizadora, desde o reconhecimento de um estímulo de elicitação até a condução da ativação de respostas de defesa (Dixon, Harrison e Lamb, 1994). Por conseguinte, possivelmente, o maior conteúdo de açúcares verificado nos frutos feridos e tratados com cálcio pode ser decorrente da sua atuação como molécula sinalizadora. O cálcio teria reconhecido o estímulo de elicitação, a partir do ferimento mecânico, sinalizando para as proteínas efetoras a necessidade de reposição do tecido lesionado, sendo portanto induzido a síntese de açúcares em maior proporção do que o tratamento com água.

#### **4.2.2.3 Cálcio ligado a parede celular**

As médias correspondentes ao teor de cálcio ligado à parede celular, de pêssegos, durante o período de 72 horas de cura, encontram-se na Tabela 9.

A análise ( $p < 0,01$ ) estatística evidenciou que os fatores tempo e tratamento, foram altamente significativos (Quadro 6 - anexo).

A análise das médias dos tratamentos indicou que o maior teor de cálcio ligado a parede celular (%), ocorreu, como esperado, no tratamento com cálcio. Os valores decresceram significativamente após 48 horas de cura do ferimento, porém, foram sempre significativamente superiores aos teores dos demais tratamentos. Não observou-se diferença entre os teores de cálcio nos frutos do tratamento controle (SF) e naqueles tratados com água (FA).

De acordo com Chéour et al. (1992) e Poovaiah, Gleen e Reddy (1988), o cálcio se associa na parede das células vegetais, através de ligações com o ácido poligalacturônico, formando os pectatos de cálcio. Os pectatos conferem maior

firmeza ao tecido vegetal, em virtude de atuarem, entre as células, como um cimento. Portanto, o aumento do cálcio ligado à parede celular possivelmente se deveu à formação dos pectatos de cálcio, conferindo maior rigidez ao tecido vegetal.

TABELA 9. Valores médios do teor de cálcio ligado a parede celular ( $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$  de tecido liofilizado de parede celular), de discos de pêssegos, submetidos aos tratamentos SF<sup>\*</sup>, FA<sup>\*\*</sup> e FC<sup>\*\*\*</sup>, durante o período de 72 horas de cura, à  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5\%$ , durante 96 horas

Tempo de cura (horas após aplicação do tratamento)	Teor de cálcio ligado a parede celular ( $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FA	FC
0	1,14 abB	1,14 aB	1,31 bcA
24	1,17 aB	1,14 aB	1,48 aA
48	1,05 abB	1,14 aB	1,39 abA
60	1,02 bB	1,05 abB	1,18 cdA
96	1,08 abAB	1,00 bB	1,14 dA
CV (%) = 5,17			

(1) \* SF (frutos sem ferimento)

(1) \*\* FA (frutos feridos e tratados com água)

(1) \*\*\* FC (frutos feridos e tratados com cálcio)

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Por outro lado, pôde-se observar que, após 24 horas de cura, o tratamento com cálcio apresentou redução no conteúdo de cálcio ligado, sendo, possivelmente, decorrente da solubilização das pectinas.

Os resultados obtidos no presente estudo são suportados por Siddiqui e Bangerth (1995); Menezes (1996) e Scalon (1996), em estudos realizados em maçã, melão e morango, respectivamente. Os autores constataram, durante o armazenamento dos referidos frutos, uma tendência de redução no conteúdo de cálcio ligado, devido à solubilização das pectinas, acarretando o amaciamento dos tecidos.

#### **4.2.2.4 Grau de esterificação das pectinas de parede celular (GE)**

As médias correspondentes ao grau de esterificação das pectinas de parede celular, de discos de pêssegos, durante o período de 96 horas de cura, foram apresentados na Tabela 10.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que os fatores tempo, tratamento, assim com a interação tempo x tratamento foram significativos (Quadro 6 - anexo).

Constatou-se nos frutos controle (SF), tendência de redução no GE das pectinas da parede celular, até 60 horas de cura, com um pequeno aumento entre 60 e 96 horas de cura (estatisticamente não significativo). Já nos frutos tratados com cálcio, ocorreu tendência de aumento no GE até 24 horas, decrescendo a seguir até 60 horas, com novo aumento até 96 horas de cura. Já os frutos tratados com cálcio, apresentaram redução contínua no GE durante as 96 horas de cura.

**TABELA 10.** Valores médios do grau de esterificação de pectinas de parede celular (GE) (%), de discos de tecidos de pêssegos, submetidos aos tratamentos SF\*, FA\*\* e FC\*\*\*, durante o período de 72 horas de cura, a uma temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5\%$ , durante 96 horas

Tempo de cura (horas após a aplicação do tratamento)	Grau de esterificação de pectinas (%) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FA	FC
0	39,24 aA	35,14 bA	41,99 bA
24	39,66 aB	39,32 bB	45,11 aA
48	33,23 bA	19,77 cC	37,76 bB
60	31,94 bB	24,44 cC	37,37 bA
96	35,80 bB	45,87 aA	34,94 bB

CV (%) = 8,08

\*SF (frutos sem fermento).

\*\*FA (frutos feridos e tratados com água).

\*\*\*FC (frutos feridos e tratados com cálcio).

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A redução no GE das pectinas ocorridas nos frutos controle e naqueles tratados com água, se deveu, possivelmente, à atuação da enzima pectinametilsterase.

Labavitch (1981), descreve a atuação da PME na desmetilação parcial da parede celular, resultando na perda de ramificações laterais de galactose e arabinose das pectinas durante o amadurecimento.

No tratamento FA, o aumento no GE, possivelmente, foi decorrente do “turnover” de açúcares não celulósicos de parede celular, ocorrido com o intuito de repor a parede celular lesada mecanicamente.

Já o decréscimo do GE ocorrido nos frutos tratados com cálcio, estimulado pela disponibilidade do íon nos frutos do tratamento FC.

Segundo Maness, Ryan e Mort (1990), a metil esterificação limita, aparentemente, a habilidade da pectina de formar ligações com o cálcio, em virtude da alteração das cargas da molécula. Sete ou mais resíduos de ácido galacturônico não metil esterificado podem ser necessários para estabilizar as ligações cruzadas, entre as cadeias de pectina adjacentes e o cálcio.

Para tomates, Pressey e Avants (1982) estabeleceram como GE ótimo, entre 30% e 47%, para a hidrólise da pectina.

Dentro dos critérios propostos por Pressey e Avants (1982), ter-se-ia, no presente estudo, com exceção do tratamento com água, valores de GE ótimos para a hidrólise da pectina, nos demais tratamentos.

No que diz respeito às tendências de aumento do GE, observados nos tratamentos, durante o tempo de armazenamento, Knee (1978) sugere que a presença de polímeros de pectinas solúvel, com maior GE, é decorrente da síntese de novo de polímeros, afim de substituir polímeros degradados.

Desta forma, seria esperado que nos tratamentos FA e FC, onde houve ruptura dos tecidos devido ao ferimento mecânico, a taxa de síntese de polímeros tivesse sido maior, e portanto, apresentasse aumento mais acentuado de GE, em relação aos frutos que não foram injuriados (SF).

Entretanto, independentemente dos tratamentos, os frutos apresentaram aumento no GE durante o armazenamento, sendo que os frutos tratados com cálcio apresentaram um aumento mais imediato.

O estudo do conteúdo de açúcares totais não celulósicos de parede celular demonstrou teores mais elevados dos mesmos nos frutos tratados com cálcio, em relação aos demais tratamentos. Desta forma, possivelmente, o cálcio tenha atuado, elicitando a síntese de novo de polímeros, a fim de repor o tecido lesado pelo ferimento, aumentando, conseqüentemente, o GE nas primeiras 24 horas, conforme sugerido por Knee (1978).

Segundo Menezes (1996), poliuronídeos com elevado GE são capazes de formar poucas ligações com o cálcio, e os complexos formados, são móveis, tendo sido observado que, quando as moléculas são desesterificadas, podem reagir com grupos carregados negativamente, que se repelem entre si, causando solubilização dos complexos. Por outro lado, poliuronídeos com baixo GE formam um elevado número de ligações com o cálcio, dando origem a complexos estáveis. Estes complexos, entretanto, quando desesterificados, são fortemente afetados.

Em virtude da disponibilidade de cálcio, e do alto GE dos frutos com cálcio, possivelmente, ter-se-ia ocorrido a formação das ligações inter-cruzadas do íon às pectinas, justificando, desta forma, a redução no GE ocorrida no tratamento FC.

A análise do cálcio ligado à parede celular (item 4.2.2.3) forneceu suporte a esta discussão, uma vez que, conforme esperado, ocorreu a incorporação do cálcio à parede celular, com o tempo de cura, nos frutos FC.

Por outro lado, nos frutos controle e tratados com água, foi evidenciado em um aumento estatisticamente significativo no GE durante a cura de feridas. Este, provavelmente, possa ter sido decorrente da perda do cálcio ligado à parede celular, fato comumente ocorrido durante o amadurecimento de frutos.

Resultados semelhantes foram obtidos em morangos tratados com cálcio a 4% e armazenados por 6 dias, em atmosfera modificada, a uma temperatura de

4°C e 80% de UR, tendo sido evidenciado, inicialmente, um aumento inicial do GE (Scalon, 1996).

#### 4.2.2.5 Lignina associada à parede celular

As médias correspondentes ao teor de lignina associada à parede celular, em pêssegos, durante o período de 96 horas de cura, foram demonstradas na Tabela 11.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que o fator tratamento, foi significativo (Quadro 6 - anexo).

Constatou-se que a síntese de lignina, ocorrida em frutos feridos e tratados com água ou cálcio, não diferiu significativamente até 96 horas de cura do ferimento, entre os tratamentos FA e FC, sendo porém superiores ao tratamento controle sem ferimento, podendo-se inferir que a indução da síntese da lignina tenha sido estimulada pelo ferimento, e não pelos tratamentos.

Associando-se o aumento da atividade da FAL (itens 4.2.1.1 e 4.3.1.1) e a síntese da lignina, pôde-se observar que nos frutos FA (com água) ocorreram às 24 horas ( $94,39 \text{ UAE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido fresco), e nos tempos 24 e 48 horas (0,89 %) respectivamente. Já no tratamento onde os frutos foram tratados com cálcio, o pico de atividade da FAL e da síntese de lignina ocorreram, respectivamente, às 36 horas ( $97,57 \text{ UAE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido fresco), e às 60 horas (0,94%). Constatou-se, portanto, uma relação direta entre o aumento da atividade da FAL e o teor de lignina, o que é consequência da FAL ser a enzima chave da síntese da lignina.



TABELA 11. Teores de lignina associada a parede celular (% de tecido seco), de discos de tecidos de pêsego, submetidos aos tratamentos SF, FA e FC durante o período de 96 horas de cura a uma temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5\%$ , durante 96 horas

Tempo de cura (horas após a aplicação do tratamento)	Teor de lignina (%) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FA	FC
0	0,58 A	0,70 A	0,76 A
24	0,61 B	0,89 A	0,87 AB
48	0,57 B	0,89 A	0,89 A
60	0,64 B	0,84 AB	0,94 A
96	0,59 B	0,87 A	0,69 AB

CV (%) = 18,40

\*SF (frutos sem ferimento)

\*\*FA (frutos feridos e tratados com água)

\*\*\*FC (frutos feridos e tratados com cálcio)

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Desta forma, possivelmente o ferimento mecânico tenha elicitado o aumento de atividade da FAL, pela indução da “síntese de novo” da enzima, conforme descrito por Hahlbrock e Scheel (1989) e Bolwell et al. (1991), levando a lignificação da injúria.

Um fator a ser considerado, com relação a lignificação de tecidos lesados, são as condições ambientais. Brown, Ismail e Balmore (1978) mencionaram que, pequenas variações na temperatura ou umidade são suficientes para impedir o processo de lignificação, tendo sido evidenciado que uma pequena elevação na

temperatura, de 30°C (temperatura ótima) para 33°C, foi suficiente para causar um efeito inibitório sobre o processo de síntese de lignina, em citrus.

Portanto, no presente estudo, aparentemente, a temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $90 \pm 5\%$ , utilizados durante a cura de ferimento, tenha sido uma condição ambiental favorável para sua síntese. Em contrapartida, a temperatura de 20°C e umidade relativa de 70% utilizadas por Moraes (1992), também em pêssegos, não favoreceu a síntese de lignina.

### **4.3 Efeito do cloreto de cálcio na elicitação de respostas de resistência à *Monilinia fructicola* (ensaio 3)**

#### **4.3.1 Atividade enzimática**

##### **4.3.1.1 Fenilalanina amônia-liase (FAL)**

As médias correspondentes à atividade da enzima FAL de pêssegos durante 48 horas de cura foram apresentadas na Tabela 12.

A análise estatística (Quadro 7 - anexo) evidenciou que os fatores tempo, tratamento, assim como a interação tempo x tratamento foram significativos ( $p < 0,01$ ).

Constatou-se tendência de aumento da atividade da FAL até 6 horas de cura do ferimento para os tratamentos FA e FC, e 24 horas para os frutos controle, declinando com o tempo de cura dos frutos. Os tratamentos com água e cálcio apresentaram atividade da FAL estatisticamente semelhantes, até 12 horas de cura. A partir das 24 horas, o tratamento onde os frutos foram tratados com

água, a atividade da FAL apresentou-se maior do que nos frutos tratados com cálcio.

TABELA 12. Valores médios da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (UAE.min<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup> de tecido fresco), de discos de tecidos de pêssegos, submetidos aos tratamentos SF<sup>\*</sup>, FAI<sup>\*\*</sup> e FCI<sup>\*\*\*</sup> e armazenados à 25 ± 3°C e umidade relativa do ar de 90 ± 5%, por 48 horas

Tempo de cura (horas após a inoculação do patógeno)	Atividade da FAL (UAE. min <sup>-1</sup> . g <sup>-1</sup> de tecido fresco) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FAI	FCI
0	56,92 bA	58,05 dA	57,01 dA
6	68,72 aB	91,89 aA	93,41 aA
12	70,87 aB	81,46 bA	75,52 bAB
24	69,27 aB	77,02 cA	70,35 bcB
48	42,24 cC	79,99 cA	63,73 cB

CV (%) = 5,04

\*SF (frutos sem fermento).

\*\*FAI (frutos feridos, tratados com água, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

\*\*\*FCI (frutos feridos, tratados com cálcio, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A tendência de aumento da atividade da PAL, observado nos frutos controle, possivelmente tenha ocorrido em função do aumento da síntese de

etileno pelos frutos, ocorrida devido ao processo de amadurecimento, assim como pelas condições ambientais de armazenamento dos mesmos.

Ridge (1975) ressalta que, além da elicitação através de injúrias e ou de patógenos, o tratamento de tecidos de trigo com etileno, aumentou, também, a atividade da FAL.

Por outro lado, nos tratamentos FAI e FCI, o aumento da atividade da PAL, foi possivelmente decorrente da elicitação causada pelos esporos de *Monilinia fructicola*, conforme relatado também por Southerton e Deverall (1990), em folhas de trigo infectadas com fungo; e por Bernards e Ellis (1991) em pecíolos de tomate inoculados com *Verticilium albo-atrum*.

Com relação ao pico de atividade da PAL, este ocorreu às 6 horas após a elicitação pela inoculação do patógeno, em contrapartida aos frutos elicitados pelo ferimento (item 4.2.1.1), cujos picos ocorreram às 24 e 36 horas para os tratamentos com água e cálcio, respectivamente. Possivelmente, os frutos inoculados responderam mais prontamente à elicitação, em decorrência da pré-existência de intermediários da via dos fenilpropanóides, cuja síntese foi induzida inicialmente pelo ferimento.

#### 4.3.1.2 Polifenoloxidase (PFO)

As médias correspondentes à atividade da enzima PFO de discos de tecidos de pêssegos, durante 48 horas de cura, encontram-se na Tabela 13.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que os fatores tempo, tratamentos, assim como a interação tempo x tratamentos, foram significativos (Quadro 7 - anexo).

A atividade da polifenoloxidase (PFO) apresentou tendência de decréscimo nos frutos controle. Nos frutos tratados com água e cálcio, houve aumento da atividade da PFO, até 24 e 6 horas após a inoculação do patógeno, respectivamente, decrescendo a seguir.

TABELA 13. Valores médios da atividade da enzima polifenoloxidase (UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de tecido fresco), observados em discos de tecidos de pêssegos, submetidos aos tratamentos SF\*, FAI\*\* e FCI\*\*\* e armazenados a uma temperatura de 25 ± 3°C e umidade relativa do ar de 90 ± 5, por 48 horas

Tempo de cura (horas após a inoculação do patógeno)	Tratamento atividade da enzima PFO (UAE.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> de tecido fresco) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FAI	FCI
0	26,24 abC	77,38 cA	57,28 dB
6	27,41 aC	81,64 bB	87,88 aA
12	25,94 abC	84,36 bA	78,62 bB
24	24,37 bC	90,46 aA	63,19 cB
48	24,32 bC	29,54 dA	39,23 eB

CV (%) = 2,19

\*SF (frutos sem ferimento).

\*\*FAI (frutos feridos, tratados com água, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

\*\*\*FCI (frutos feridos, tratados com cálcio, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Por ser uma proteína de membrana (Sanchez-Ferrer e Garcia-Carmona, 1989), possivelmente a germinação dos esporos de *Monilinia fructicola*,

inoculados no fermento dos pêssegos, tenha acarretado na ruptura da célula e portanto na ativação da PFO.

Os menores valores da atividade da PFO observados no tratamento com cálcio, são, certamente, decorrentes da capacidade de restabelecimento de membranas desorganizadas, diante da adição de cálcio (Jones e Lunt, 1967).

Desta forma, durante o período de cura de 48 horas, realizado entre o ferimento seguido pelo tratamento dos frutos com cálcio e a inoculação com *Monilinia fructicola*, possivelmente tenha ocorrido a reorganização das membranas, devido à incorporação do cálcio à membrana e à parede celular, tornando-as menos susceptíveis ao ataque de *Monilinia fructicola* em relação aos frutos feridos e tratados com água, justificando, portanto, a menor atividade da PFO nos frutos FCI.

#### 4.3.1.3 Peroxidase (POD)

As médias correspondentes à atividade da enzima POD de discos de tecido de pêssegos, durante o período de 48 horas de cura, encontram-se na Tabela 14.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que os fatores tempo, tratamento, assim com a interação tempo x tratamento foram significativos (Quadro 7 - anexo).

A atividade da POD apresentou tendência de redução até 6 e 12 horas de cura, nos tratamentos com água e cálcio respectivamente, aumentando a seguir, com um pico de atividade a 48 horas de cura. Os frutos

tratados com cálcio apresentaram menor atividade da POD em relação ao tratamento com água, às 24 horas de cura. O tratamento controle com água as 24 e 48 horas de cura. O tratamento controle manteve-se constante durante as 48 horas de cura.

TABELA 14. Valores médios da atividade da enzima peroxidase (UAE.min<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup> de tecido fresco), de discos de tecidos de pêesegos, submetidos aos tratamentos SF\*, FAI\*\* e FCI\*\*\* e armazenados à uma temperatura de 25 ± 3°C e umidade relativa do ar de 90 ± 5, por 48 horas

Tempo de cura ( horas após a inoculação do patógeno)	Atividade da enzima PFO (UAE.min <sup>-1</sup> . g <sup>-1</sup> de tecido fresco) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FAI	FCI
0	12,58 aC	23,63 bA	23,71 bB
6	11,93 aA	11,95 dA	12,12 cA
12	11,68 aB	13,33 dA	12,95 cAB
24	12,60 aB	15,33 cA	13,38 cB
48	12,71 aC	24,63 aA	23,71 aB

CV (%) = 4,79

\*SF (frutos sem fermento).

\*\*FAI (frutos feridos, tratados com água, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

\*\*\*FCI (frutos feridos, tratados com cálcio, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo em frutos, cuja a elicitação foi feita pelo ferimento mecânico (item 4.2.1.3).

É provável que a redução da atividade das enzimas estudadas FAL, POD e PFO, diante da aplicação do cálcio, verificada no presente estudo, tenha sido decorrente da capacidade de restabelecimento da membrana (Jones e Lunt, 1967) e rigificação da parede celular (Chéour et al., 1992), dificultando assim, a descompartimentalização de organelas, como vacúolos, o acesso da enzima ao seu respectivo substrato e acarretando portanto, na menor atividade da enzima.

A peroxidase, assim como a fenilalanina amônia-liase, e polifenoloxidase, certamente desempenharam um papel importante na indução do sistema de resistência como um mecanismo de defesa contra a invasão da *Monilinia fructicola* (Zheng e Van Huystee, 1992; Ludwig-Muller et al., 1994), o que foi confirmado com a redução da área lesada pelo fungo, e do índice de doença.

#### **4.3.2.1 Análise da parede celular (ensaio 3)**

##### **4.3.2.1 Açúcares neutros totais não celulósicos de parede celular**

O teor médio de açúcares neutros totais não celulósicos de parede celular (mg/g) encontram-se na Tabela 15.

Através da análise estatística ( $p < 0,01$ ) foi evidenciado que os fatores tempo, tratamento, assim com a interação tempo x tratamento foram significativos (Quadro 8 - anexo).

Os frutos tratados com água e inoculados apresentaram tendência de aumento no teor de açúcares neutros totais não celulósicos de parede celular até 36 horas de cura, com posterior redução, embora às 48 horas, os valores permanecessem mais elevados que no tempo zero.

Nos frutos tratados com cálcio, os açúcares neutros totais não celulósicos de parede celular apresentaram-se mais elevados que nos frutos tratados com água, com tendência na redução até 48 horas. Neste tempo, o conteúdo de açúcares foi estatisticamente semelhante para ambos os tratamentos.

TABELA 15. Valores médios do teor de açúcares neutros totais não celulósicos de parede celular (mg/g de tecido seco), presentes em discos de pêssegos, submetidos aos tratamentos FAI\* e FCI\*\* e armazenados a uma temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5$ , por 48 horas

Tempo de cura (horas após a inoculação do patógeno)	Teor de açúcares neutros totais não celulósicos de parede celular (mg/g) por tratamento <sup>1</sup>	
	FAI	FCI
0	273,03 cB	373,52 aA
12	290,72 bcB	324,57 bA
24	345,90 aB	376,41 aA
48	308,93 bA	310,01 bA
CV (%) = 4,64		

\*FAI (frutos feridos, tratados com água, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

\*\*FCI (frutos feridos, tratados com cálcio, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A alteração do teor de açúcares neutros ocorrida na parede celular dos frutos feridos e inoculados com *Monilinia fructicola*, possivelmente teve como objetivos, além de repor os açúcares hidrolisados da parede celular, em decorrência da ação de enzimas fúngicas, induzir uma possível alteração dos açúcares neutros da parede celular, com o intuito de torná-la mais resistente às enzimas fúngicas. Reese, Maguire e Parrish (1968); English e Albersheim (1969) propuseram que a alteração dos açúcares neutros poderia contribuir para a resistência da parede celular às enzimas fúngicas, em virtude da alteração da especificidade da reação enzima-substrato ou da alteração do meio de crescimento do patógeno. Os mesmos autores relatam, também, que a composição do meio poderia atuar diretamente no desenvolvimento de fungos. Num estudo realizado durante o crescimento de fungos patogênicos, em meio contendo monossacarídeos, foi observado que, quando a glicose ou a combinação da glicose com outros monossacarídeos estavam presentes, o crescimento dos fungos era estimulado. Por outro lado, quando o meio continha de 5 a 50  $\mu\text{M}$  de galactose, a germinação da *Monilinia fructicola* era completamente inibida. O crescimento das colônias era inibido diante da presença de ácido galacturônico e xilose.

Existem portanto, diferenças na habilidade dos fungos patogênicos em utilizarem os monossacarídeos liberados da parede celular, como fonte de carbono para o seu crescimento.

Diante destas observações, poder-se-ia inferir que, nos frutos tratados com cálcio, a hidrólise dos polissacarídeos da parede celular dos pêssegos e a liberação de açúcares para o meio, modificando a sua composição, teriam atuado inibindo o crescimento do fungo (Reese, Maguire e Parrish, 1968; English e Albersheim, 1969), em maior proporção do que os frutos tratados com água.

Moraes (1992) comenta que, se a planta proporcionar ao patógeno uma mistura de açúcares ou polissacarídeos, que poderia alterar quantitativa e qualitativamente a produção de enzimas degradantes dos polissacarídeos do hospedeiro; poderia resultar num desenvolvimento abortivo do patógeno, podendo tornar, desta forma, a planta resistente ao mesmo.

Provavelmente, a aplicação do cálcio (tratamento FCI) tenha alterado a mistura de açúcares fornecida ao patógeno, de forma mais eficiente que a água (tratamento FAI), resultando, desta forma, num maior número de patógenos abortados e portanto, na maior resistência dos frutos FCI, em relação ao FAI.

#### 4.3.2.2 Cálcio ligado à parede celular

As médias correspondentes ao teor de cálcio ligado à parede celular de discos de tecido de pêssegos, durante o período de 48 horas de cura, encontram-se na Tabela 16.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que os fatores tempo e tratamento, foram significativos (Quadro 8 - anexo).

Pode-se supor, portanto, que o cálcio aplicado tenha se ligado aos ácidos poligalacturônicos de parede celular, formando zonas de ligação do tipo "egg box" (pectatos de cálcio), conforme proposto por Tu et al. (1992), conferindo, certamente, maior rigidez à parede das células, e dificultando a ação de enzimas pectolíticas liberadas pela *Monilinia fructicola*.

De acordo com Conway e Sams (1983) o cálcio retarda a ação de fungos, de modo similar ao seu mecanismo de atuação, ao retardar a senescência.

MacGuire e Kelman (1986) propuseram que, na interação patógeno-planta, o aumento nos níveis de cálcio nos tecidos vegetais, e sua localização na parede celular, resultem no aumento da resistência do tecido à maceração. Portanto, devido à incorporação do cálcio na parede dos frutos FCI, ocorreu uma maior rigificação da mesma, tornando-a menos susceptível à maceração pelas enzimas fúngicas e portanto, mais resistentes à podridão parda (item 4.4.1).

TABELA 16. Valores médios do teor de cálcio (% de tecido seco), observado em discos de tecidos de pêssegos, submetidos aos tratamentos FAI\* e FCI\*\* e armazenados a uma temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5$ , por 48 horas

Tempo de cura (horas após a inoculação do patógeno)	Teor de cálcio (%) por tratamento <sup>1</sup>	
	FAI	FCI
0	1,14 aB	1,39 aA
12	1,14 aB	1,32 bA
24	1,12 aB	1,34 bA
48	1,14 aB	1,31 bA

CV (%) = 2,68

\*FAI (frutos feridos, tratados com água, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

\*\*FCI (frutos feridos, tratados com cálcio, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 4.3.2.3 Grau de esterificação de pectinas de parede celular (GE)

As médias correspondentes ao grau de esterificação das pectinas de parede celular de discos de tecido de pêssegos, durante o período de 48 horas de cura, foram apresentadas na Tabela 17.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que os fatores tempo, tratamento, assim como a interação tempo x tratamento foram significativos (Quadro 8 - anexo).

TABELA 17. Valores médios do grau de esterificação de pectinas de parede celular (GE) (% de tecido seco), observado em discos de tecidos de pêssegos, submetidos aos tratamentos FAI\* e FCI\*\* e armazenados à  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5$ , por 48 horas

Tempo de cura (horas após a inoculação do patógeno)	Grau de esterificação de pectinas de parede celular (GE) (%) por tratamento <sup>1</sup>	
	FAI	FCI
0	28,82 cB	37,74 aA
12	31,77 bB	41,26 aA
24	34,98 bB	42,00 aA
48	48,69 aA	41,60 aB
CV (%) = 14,97		

\*FAI (frutos feridos, tratados com água, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

\*\*FCI (frutos feridos, tratados com cálcio, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O GE aumentou em ambos os tratamentos, com valores mais elevados em frutos submetidos à aplicação de cálcio no local do ferimento, exceto 48 horas após a inoculação com *Monilinia fructicola*.

O aumento no GE das pectinas da parede celular, observado nos dois tratamentos (FAI e FCI), possivelmente tenha sido decorrente da síntese “de novo” de polímeros, a fim de repor os tecidos feridos mecanicamente, sendo possivelmente, o processo de reposição mais intenso nos frutos tratados com cálcio.

Knee (1978) sugere que a presença de polímeros de pectinas solúveis, com maior GE é decorrente da síntese “de novo”, a fim de substituírem aqueles degradados.

Segundo Ferguson e Drobak (1988) o cálcio é capaz de elicitar uma série de respostas intracelulares, fazendo a transmissão de estímulos externos em eventos imediatos a metabólicos.

Portanto, é provável que o cálcio tenha atuado elicitando a síntese de poliuronídeos de parede celular no sítio da injúria inoculado com a *Monilinia fructicola*.

#### 4.3.2.4 Lignina associada à parede celular

As médias correspondentes ao teor de lignina associada à parede celular em discos de tecidos de pêssegos, durante o período de 48 horas de cura, foram demonstradas na Tabela 18, Figura 19.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que o fator tempo foi significativo (Quadro 8 - anexo).

TABELA 18. Valores médios do teor de lignina associada a parede celular (% de tecido seco), observado em discos de tecidos de pêssegos, submetidos aos tratamentos FAI\* e FCI\*\* e armazenados à 25 ± 3°C e umidade relativa do ar de 90 ± 5%, por 48 horas

Tempo de cura (horas após a inoculação do patógeno)	Teor de lignina associada a parede tratamento celular (%) por tratamento <sup>1</sup>	
	FAI	FCI
0	1,08 c	1,03 b
12	1,66 a	1,59 a
24	1,48 b	1,45 a
48	1,49 b	1,43 a

CV (%) = 4,91

\*FAI (frutos feridos, tratados com água, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

\*\*FCI (frutos feridos, tratados com cálcio, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A presença do cálcio no local de ferimento não induziu a síntese de lignina, uma vez que os teores foram estatisticamente semelhante nos tecidos submetidos à aplicação de água ou de cálcio, antes da inoculação. Entretanto, em ambos os tratamentos, houve aumento no teor de lignina na parede celular, a partir de 12 horas após a inoculação com o patógeno, coincidente com a maior atividade da FAL (item 4.3.1.1) o que pode ser atribuída à presença de esporos de *Monilinia fructicola* no local de ferimento.

Segundo Southerton e Deveral (1990), o aumento inicial dos níveis de enzima FAL poderia estar associado com a expressão da resistência, uma vez

que, freqüentemente, se correlaciona com a formação de lignina em tecidos doentes.

Observou-se ainda que os teores de lignina foram cerca de duas vezes superiores àqueles dos frutos submetidos a 48 horas de cura de ferimento (ensaio 2, item 4.2.2.5), porém sem inoculação.

Houve portanto, uma indução mais rápida nas respostas de resistência pela presença de esporos de *Monilinia fructicola*, do que pelo ferimento, quanto a síntese de lignina.

Notou-se portanto, que os esporos de *Monilinia fructicola* induziram a síntese de lignina, independentemente da presença do cálcio.

De acordo com Vance, Kirk e Sherwood (1980) e com Adirkaram et al., (1992), a quitina presente na parede celular de fungos pode atuar como matriz para a lignificação. Portanto, é possível que os precursores de lignina tenham reagido com os polímeros da parede celular dos fungos, ativando o sistema de reconhecimento.

Em tecidos de raízes de cenoura feridos e infectados por *Botrytis cinerea*, evidenciou-se a formação de barreiras formadas a partir de lignina e suberina, após 2 e 6 dias, respectivamente (Harding e Heale, 1980).

Em virtude das paredes celulares lignificadas apresentarem-se mais resistentes ao ataque de enzimas, Brown e Balmore (1993) sugeriram que a lignificação da hifa do patógeno no sítio da injúria, poderia evitar o crescimento da hifa fúngica.

Smit e Dubery (1997) formularam a hipótese de que a deposição de lignina e as ligações cruzadas covalentes com os carboidratos e proteínas, durante a sua polimerização, interferem na hidrólise enzimática e na penetração mecânica do tecido vegetal por patógenos fúngicos, podendo impedir também o movimento de água e moléculas difusíveis entre a planta e o fungo.

Observou-se também que as células vegetais colocadas em contato com elicitores provenientes de fungos, apresentavam uma elevação do cálcio citosólico, induzindo a síntese de proteínas associadas a patogênese (Knight et al., 1991).

Pode-se supor portanto, que no presente estudo, apesar dos tratamentos água e cálcio, aplicados no fermento dos pêssegos, não terem fornecido resposta significativamente diferentes com relação a síntese de lignina, possivelmente os ions cálcio tenham se ligado aos polissacarídeos da parede celular dos pêssegos, ou mesmo das hifas fúngicas, atuando de forma a reduzirem o alastramento do patógeno. Estes resultados são suportados pela constatação da redução tanto da área lesionada, quanto do índice de doença, ocorrida no presente estudo, nos frutos tratados com cálcio, conforme descrição no item 4.4.1.

Provavelmente, ao serem colocadas em contato com esporos de *Monilinia fructicola*, as células localizadas no fermento dos frutos de pêssego que haviam recebido o tratamento exógeno com cálcio, apresentaram uma maior elevação do cálcio citosólico, ativando consequentemente, as proteínas associadas a patogênese, que poderiam também ter atuado na resistência dos frutos tratados com cálcio, em relação aos tratados com água.

#### **4.4 Grau de resistência dos tecidos ao desenvolvimento de lesões pela *Monilinia fructicola***

##### **4.4.1 Área lesionada pela podridão parda e índice de doença**

As médias correspondentes às áreas lesionadas pela podridão parda de

pêssegos, durante 72 horas após a inoculação com esporos do patógeno, foram apresentadas na Tabela 19.

A análise estatística ( $p < 0,01$ ) evidenciou que os fatores tempo, tratamento, assim com a interação tempo x tratamento foram significativos (Quadro 9 - anexo).

As áreas lesionadas pela podridão parda dos pêssegos, apresentaram aumento com o decorrer do tempo, após a inoculação dos ferimentos, sendo maiores em frutos previamente feridos e tratados com água, em relação àqueles feridos e tratados com cálcio.

TABELA 19. Valores médios da área lesionada pela podridão parda ( $\text{cm}^2$ ), observadas em pêssegos, submetidos aos tratamentos SF<sup>\*</sup>, FAI<sup>\*\*</sup> e FCI<sup>\*\*\*</sup> e armazenados à  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $90 \pm 5$  por 48 horas

Tempo após a inoculação do patógeno (horas)	Área lesionada pela podridão parda ( $\text{cm}^2$ ) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FAI	FCI
24	0 aA	0,03 cA	0 bA
48	0 aB	5,16 bA	1,27 bB
72	0 aC	8,68 aA	5,7 aB

\*SF (frutos sem ferimento).

\*\*FAI (frutos feridos, tratados com água, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

\*\*\*FCI (frutos feridos, tratados com cálcio, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em virtude do enrijecimento do tecido vegetal, produzido pelo cálcio, pôde-se evidenciar uma redução de 34,33% na área lesionada de frutos tratados com o ion e inoculado com esporos de *Monilinia fructicola*, (FCI), em relação aos frutos tratados com água (FAI).

No que diz respeito ao índice de doença (ID) (Tabela 20), observou-se uma redução de 19,29% no índice de doença nos frutos previamente tratados com cálcio, em relação àqueles tratados com água.

É sabido que o cálcio pode atuar, também, como mensageiro secundário na tradução de sinais. A percepção dos mesmos ocorreria a partir de receptores e efetores localizados na célula, desencadeando as respostas (Bush, 1993).

Com o aumento dos níveis do cálcio, ocorreria a formação de complexos cálcio-proteínas alvo, que regulam a atividade de efetores de proteínas, o que determinaria, por sua vez, a resposta da célula (Bush, 1993).

TABELA 20. Índice de doença (%), observado em pêssegos, submetidos aos tratamentos SF<sup>\*</sup>, FAI<sup>\*\*</sup> e FCI<sup>\*\*\*</sup> e armazenados à 25 ± 3°C e umidade relativa do ar de 90 ± 5

Tempo de cura (horas após a inoculação do patógeno)	Índice de doença (%) por tratamento <sup>1</sup>		
	SF	FAI	FCI
72	0	74,29	55,00

<sup>\*</sup>SF (frutos sem fermento).

<sup>\*\*</sup>FAI (frutos feridos, tratados com água, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

<sup>\*\*\*</sup>FCI (frutos feridos, tratados com cálcio, curados por 48 horas e inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*).

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Portanto, pode-se supor que o efeito do cálcio na redução da área de infecção, assim como no índice de doença, possivelmente tenha sido resultante da formação de uma barreira mecânica, por se ligar a grupos carboxílicos dos polímeros de poligalacturonatos, na parede celular do hospedeiro, levando a uma maior coesão entre as células, retardando conseqüentemente a atividade de enzimas degradativas de parede celular liberadas pelo fungo, em virtude de tornarem as células mais resistentes à maceração, conforme preconizado por Mascarenhas (1977), Chéour et al. (1992) e Wang et al., (1993).

Possivelmente, o fornecimento do cálcio exógeno tenha levado a um maior número de ligações entre o cálcio e as proteínas alvo, desencadeando respostas celulares mais rápidas, diante do ataque de patógenos, impedindo mais rapidamente o alastramento da doença (Knight et al., 1991).

Por outro lado, o cálcio poderia induzir também a formação de uma barreira química, com a síntese de fitoalexinas, conforme sugerido por Ishihara et al.(1996).

Pode-se inferir ainda, como discutido anteriormente, (ítem 4.3.2.1), que o cálcio aplicado poderia ter induzido a alteração da composição de açúcares neutros liberados da parede celular dos tecidos feridos de pêssegos, dificultando a ação de enzimas fúngicas, em decorrência da não especificidade das enzimas para os açúcares da parede dos frutos. Poderia, também, ter ocorrido a liberação de determinados açúcares da parede dos frutos, para o meio que poderiam reduzir, ou mesmo inibir o crescimento da *Monilinia fructicola*.

Moraes (1992) menciona que se a planta alterar a mistura de açúcares ou polissacarídeos da parede celular, poderá haver uma alteração qualitativa e/ou quantitativamente a produção de enzimas degradantes dos polissacarídeos do hospedeiro, podendo resultar num desenvolvimento abortivo do patógeno, podendo assim tornar a planta resistente ao mesmo.

A influência da alteração do meio ambiente do patógeno na patogenicidade foi demonstrada por Moline e Gross (1984) que estudando o crescimento de 5 fungos patogênicos em meio contendo monossacarídeos liberados da parede celular, verificaram que a germinação de esporos de *Monilinia fructicola* foi completamente inibida por 5 a 50  $\mu\text{M}$  de galactose e o crescimento das colônias inibido por ácido galacturônico e xilose.

De acordo com Pan, Ye e Kué (1992) existem evidências de que a susceptibilidade ou a resistência a uma determinada doença é determinada não pela presença ou ausência de genes para os mecanismos de resistência, mas pela rapidez ou magnitude com a qual a informação genética é expressa. Essa evidência é suportada por pesquisas que evidenciaram que a resistência, pode ser induzida, sistematicamente, em plantas susceptíveis pelo uso de elicitores bióticos ou abióticos (Kué e Rush, 1985; Tuzun e Kué, 1989).

Isto sugere portanto, que a lignificação não seja, provavelmente, um fator decisivo nos estádios iniciais da resposta de defesa, porém poderia reforçar a resistência de plantas em estádios mais tardios ou em infecções que se tornassem estabilizadas em vários dias (Matern, Grimmig e Kneusel, 1995).

De acordo com Matern, Grimmig e Kneusel (1995), o reforço da parede celular com lignina poderia conferir resistência, apenas se a lignificação ocorresse rapidamente, com o avanço do ingresso da hifa fúngica.

Em síntese, a maior resistência à infecção fúngica, ocorrida nos frutos tratados com cálcio, pode ter sido decorrente da ação do cálcio na transmissão de sinais, percebidos a partir de proteínas receptoras e efetoras presentes na membrana plasmática, desencadeando respostas de defesa.

## **5 CONCLUSÕES**

- Os pêssegos da cv Biuti utilizados no experimento apresentaram boas características de qualidade até 4 dias de armazenamento a  $25^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$  e  $90 \pm 5\%$  de umidade relativa.
- A atividade das fenilalanina amônia-liase (FAL), polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD), foi estimulada, em pêssegos, pelo ferimento mecânico.
- O pico de atividade das enzimas de pêssego (FAL, POD e PFO), foi retardado pela aplicação de cloreto de cálcio a 1%, no local do ferimento mecânico.
- A aplicação de cloreto de cálcio a 1% no local do ferimento mecânico, promoveu uma síntese de açúcares neutros e reduziu o grau de esterificação das pectinas da parede celular de pêssegos, em relação aos frutos tratados com água.

- Os açúcares neutros predominantes na parede celular dos pêssegos foram a arabinose, galactose e a glicose.
- O ferimento mecânico, induziu a síntese de lignina, independentemente da aplicação de cloreto de cálcio no local da injúria.
- A inoculação de esporos de *Monilinia fructicola* em ferimentos de pêssegos, curados por 48 horas a  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e UR de  $90 \pm 5\%$ , antecipou e induziu o aumento da atividade das enzimas FAL, POD e PFO.
- A indução da atividade das enzimas FAL, POD e PFO pela inoculação do patógeno em ferimento mecânico, curado por 48 horas a  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e UR de  $90 \pm 5\%$ , foi reduzida pela aplicação de cloreto de cálcio a 1%.
- A aplicação de cloreto de cálcio a 1% em ferimentos de pêssego, curados por 48 horas, e posteriormente inoculado com esporos de *Monilinia fructicola*, reduziu em 34,33% a área lesada pela podridão parda, e em 19,29% o índice de infecção dos pêssegos, quando comparados aos frutos tratados com água.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Informações precisas acerca das respostas de plantas a ferimentos, são essenciais para o entendimento dos processos que facilitem ou interfiram no desenvolvimento de patologias, em decorrência de muitas doenças, causadoras de grandes perdas econômicas, serem induzidas por patógenos que penetram nos tecidos vegetais através dos ferimentos.

O estudo dos mecanismos envolvidos no processo de cura de ferimentos e resistência dos tecidos vegetais a patógenos, é essencial para o controle de várias patologias pós-colheita, uma vez que possibilitará desenvolver técnicas específicas, visando a diminuição das perdas, melhoria da qualidade, queda nos custos de produção e aumento da disponibilidade de frutos comercializáveis.

Neste estudo, ao se fazer um ferimento mecânico dos frutos, buscou-se simular uma situação que normalmente ocorre durante a colheita, transporte ou mesmo comercialização dos frutos, utilizando-se o cálcio, íon de grande aplicabilidade na pós-colheita de frutos.

Outros trabalhos poderiam ser conduzidos utilizando-se outras fontes de cálcio, como o nitrato de cálcio. Algumas literaturas relatam que o nitrato de cálcio apresenta-se menos eficiente do que o cloreto de cálcio na penetração pela cutícula. Todavia, em virtude de trabalhos na mesma linha de pesquisa do presente estudo, aplicar o cálcio diretamente dentro de ferimentos, possivelmente não ocorreriam problemas, sendo inclusive, interessante o estudo do efeito conjunto do cálcio e do nitrogênio (nitrato de cálcio), tanto na cura quanto na resistência de pêssegos à *Monilinia fructicola*. Paralelamente, níveis de cálcio superiores a 1% poderiam também ser testados.

Sugeriria também, estudos que envolvessem a utilização de poliaminas, uma vez que estas, por serem cátions, atuam de forma semelhante ao cálcio a nível de membrana e parede celular.

Conjuntamente, o estudo histoquímico dos tecidos circundantes ao ferimento, utilizando microscopia eletrônica, poderia fornecer informações importantes com relação a formação de lignina, assim como a associação do cálcio e/ou poliaminas à parede celular.

Finalmente, poderiam ser desenvolvidos, estudos que envolvessem ionoforos de cálcio. Desta forma, poder-se-ia avaliar a real contribuição do cálcio fornecido exogenamente como mensageiro secundário na elicitação de respostas de defesa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B.; BILES, C.L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiology*, Washington, v.95, n.1, p.269-273, Jan., 1991.
- ACEBES, J.L.; LORENCES, E.P.; REVILLA, G.; ZARRA, I. Pine xyloglucan: occurrence, localization and interaction with cellulose. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.89, p.417-422, 1993.
- ADIRKARAM, N.K.B.; EWING, D.F.; KARUNARATNE, A.M.; WIJERATNE, M.K. Antifungal compounds from immature avocado fruit peel. *Phytochemistry*, Elmsford, v.31, n.1, p.93-96, 1992.
- AGRIOS, G.N. *Plant pathology*, 4 ed. California: Academic Press, California, 1996.
- AIST, J.R. Papillae and related wound plug of plant cell. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.14, p.145-163, 1976.
- AKAI, S. Histology of defense in plants. *Plant disease: an advanced treatise. How plants defend themselves*. In: Horsfall ; J.G.; Cowling, E.B. (eds.). Londres: Academic Press, 1980. V.5, p.391-437.

- ALBERSHEIM, P.; JONES, T.M.; ENGLISH, P.D. Biochemistry of cell wall in relation to infective process. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.7, p.171-194, 1969.
- ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D.; KARR, A. A method for the analysis of sugar in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v.5, p.340-345, 1967.
- ALBERSHEIM, P.; VALENT, B.S. Host-pathogen interactions in plants. Plants when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. *Journal of Cell Biology*, New York, v.78, p.627-643, 1978.
- ALDINGTON, S.; FRY, S.C. Oligosaccharins. *Advanced in Botanical Research*, San Diego, v.19, 100-101, 1993.
- ALEXANDRE, J.; LASSALLES, J.P.; KADO, R.T. Opening of  $Ca^{2+}$  channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature*, London, v.343, p.567-70, 1990.
- ALVARENGA, L.R.; FORTES, J.M. Cultivares de fruteiras de clima temperado, *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.11, n.124, p.3-26, 1985.
- AMPOMAH, Y.A.; FRIEND, J. Insoluble phenolic compounds and resistance of potato tuber disc to *Phytophthora* and *Phoma*. *Phytochemistry*, Elmsford, p. 2533-2541, 1988.
- ANDERSON, J.W. Extraction of enzymes and subcelular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, Oxford, v.7, p.1973, 1968.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. *Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemistry*, 12 ed., Washington, 1992.
- BALARDIN, R.S.; BALARDIN, C.R.R.; CHAVES, L.C.S. Eficiência de fungicidas e diferentes doses no controle de *Monilines fructicola* (Wint) sobre frutos do pessegueiro (*Prunus persica* var. vulgaris), em pós-colheita. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.24, p.15-17, 1994.

- BALLS, A.K.; HALE, W.S.** On peroxidase. *Journal of Biological Chemical*, v.107, p.767-782. 1934.
- BALLOD, L.B.** Qualidade e potencial de conservação sob atmosfera modificada de pêssegos (*Prunus persica* (L.) Batsch), cultivares delícia e talismã, Lavras: ESAL, 1990. 118p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- BANGERT, F.** Calcium-related physiological disorders of plant. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.17, p.97-122, 1979.
- BANGERT, F.; DILLEY, D.R.; DEWEY, D.H.** Effect of postharvest calcium treatments on intenal breakdown and respiration of apple friuts. *Journal of American Society Horticultural Science*, Alexandria, v.97, p.679-682, 1972.
- BANKO, T.J.; HELTON, A.W.** *Cytospora* induced change in stems of *Prunus persica*. *Phytopathology*, St. Paul, v.64, p.899-901, 1974.
- BAR-NUN, N.; MAYER, A.M.** Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, Elmsford, v.29, n.3, p.787-791, 1990.
- BARTNICKI-GARCIA, S.** Cell wall chemistry morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.22, p.87-108. 1968.
- BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y.** Peroxidase, polyphenoloxidase and phenols in relation to resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato plants. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.65, n.2, Feb., 1987.
- BATEMAN, D.F.** An induced mechanism of tissue resistance to poligalacturonase in hipocótils of bean infected with *Rhizoctonia*. *Phytopatology*, St. Paul, v.54, p.438-445, 1966.
- BATEMAN, D.F.; BASHAM, H.G.** Degradation of plant cell wall and membranes by microbial enzymes. In: Heitefuss, R.; Williams, P.H. (eds.). *Encyclopedia Plant Physiology - Physiological Plant Pathology*, Berlin:Springer-Verlag, 1976. v.4, p.316-355.

- BAUDOIN, A.B.A.M.; ECKERT, J.W. Development of resistance against *Geotrichum candidum* in lemon peel injuries. *Phytopathology*, St. Paul, v.74, n.2, 1985.
- BELL, A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.32, p.21-81, 1981.
- BALARDIN, R.S.; BALARDIN, C.R.R; CHAVES, L.C.S. Eficiência de fungicidas e diferentes doses no controle de *Monilines fructicola* (Wint) sobre frutos do pessegueiro (*Prunus persica* var. vulgaris), em pós-colheita. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.24, p.15-17, 1994.
- BENHAMOU, N., GRENIER, J.; CHRISPPEELS, J.M. Accumulation of  $\beta$ -frutósídate in cell wall of tomato roots following infection by a fungal wilt patogen. *Plant Physiology*, Washington, v.97, n.2, Oct, 1991.
- BERNARDS, M.A.; ELLIS, B.E. Phenylalanina amônia-liase from tomato cell cultures inoculated with *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology*, Washington, v.97, p.1494-1500, 1991.
- BERTON, O; SCHROEDER, A-L; BLEICHER, J. Controle de podridões em pêssegos através de tratamentos em pré e pós-colheita. *Agropecuária Catarinense*, v.5, n.3, set. 1992.
- BIGGS, A.R. Boundary-zone formation in peach bark in response to woulds and *Cytospora leucostoma* infection. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.62, p.2814-2821, 1984
- BIGGS, A.R.; MILES, N.W. Association of suberin formation in noninoculated woulds with susceptibility to *Leucostoma cineta* and *L. personii* in various peach cultivars. *Phytopatology*, St. Paul, v.78, p.1071-1070, 1988.
- BIRECKA, H. ; CATALFAMO, J.L.; URBAN, P. Cell wall and protoplast isoperoxidasas in tabacco plants in relation to mechanical injury and infection with tabacco mosaic virus. *Plant Physiology*, Washington, v.55, p.607-610, 1975.
- BLEINROTH, E.W. Colheita e armazenamento de frutas e hortaliças para processamentos. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*. Campinas, n.19, p.37-51, 1969.

- BOLWELL, G.P.; COULSON, V.; RODGERS, M.W.; MURPHY, D.L.; JONES, D.** Modulation of the elicitation response in cultured french bean cells and its implication for the mechanism of signal transduction. *Phytochemistry*, Elmsford, v.30, n.2, p.397-405, 1991.
- BORCHERT, R.** The course and spatial distribution os phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activity in wounded potato tuber tissue. *Plant Physiology*, Washington, v.62, p.789-793, 1978.
- BOWER, J.P.; CUTTING, J.G.M.** Avocado fruit development and ripening physiology. *Horticultural Reviews*, New York, v.10, p.229-271, 1988.
- BRADLEY, D.J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C.J.** Elicitor and would-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, Cambridge, v.21-30, 1992.
- BRASIL.** Comercio exterior: exportação. Rio de Janeiro, SECEX, 1994.
- BREET, C.; WALDRON, K.** *Physiology and biochemistry of plant cell walls.* London: Unwin Hyman, 1990. 193p.
- BRISKIN, D.P.** Ca<sup>2+</sup>-translocating ATPase of the plant plasma membrana. *Plant Physiology*, Washington, v.94, n.2, 1990.
- BROWN, E.G.** Development of green mold in degreened oranges . *Phytopathology*, St.Paul, v.63, 1973.
- BROWN, E.G.** Host defenses at the would site on harvested crops. *Phytopathology*, St.Paul, v.79, n.12, 1989.
- BROWN, G.E.; BALMORE, C.R.** Resistence of healed citrus exocarp to penetration by *Penicillium digitatum*. *Phytopathology*, St.Paul, v.73, p.691-694. 1993.
- BROWN, G.E.; ISMAIL, M.A.; BALMORE, C.R.** Lignification of injuries to citrus fruit and susceptibility to green mold. *Proceeding of the Florida State Horticultural Society*, Deland, v.91, p.124-126, 1978.

- BRUCE, R.J. GALSTON, A.W. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology*, Washington, v.91, p.889-897, 1989.
- BRUCE, R.J.; WEST, C.A. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology*, Washington, v.91, p.889-897, 1989.
- BUSH, D.S. Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiology*, Washington, v.103, n.1, p.7-13, 1993.
- BUSH, D.S.; BISWAS, A.K.; JONES, R.L. Gibberellic-acid-stimulated  $Ca^{+2}$  transport in the endomembrane system of the barley aleurone. *Planta*, Berlin, v.178, p.411-420, 1989.
- BUTLER, G.W.; BAILEY, R.W. *Chemical and biochemistry of herbage*. London: Academic Press, 1973, vol. 1, 416p.
- CAM, E.L.; TOWERS, G.H.N. Review article. Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*, Elmsford, v.12, p.961-973, 1973.
- CARRY, J. P.; KLESSIG, D. F. The pathogenesis-related proteins in plants. In: Setlow, J.K. (ed.). *Genetic engineering principles and methods*. New York: Plenum Press, 1989. V.2, p.65-109.
- CASTAÑEDA, P.; PEREZ, M. Calcium ions promote the response of *Citrus limon* against fungal elicitors or wounding. *Phytochemistry*, Oxford, v.42, n.3, p.595-598, 1996.
- CHAPMAN, G.W.; HORVAT, R.J. Changes in nonvolatile acids, sugar, pectin and sugar composition of pectin during peach (Cv Monroe) maturation. *Journal of Agricultural Food Chemical*, n.38, p/383-387, 1990.
- X CHÉOUR, F.; ARUL, J; MAKHLOUF, J.; WILLEMOT, C. Delay of membrane lipid degradation by calcium treatment during cabbage leaf senescence. *Plant Physiology*, Washington, v.100, n.4, 1992.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. *Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio*. Lavras, ESAL/FAEPE, 1990. 320P.

- CHITARRA, M.I.F.; CARVALHO, V.D.C.** Qualidade e industrialização de frutos temperados: pêssegos, ameixas e figos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 1985.
- CHITARRA, M.I.F.; LABAVITCH, J.M.; KADER, A.A.** Canning-induced fruit softening and cell wall pectin solubilization in the "Patterson" Apricot. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.4, p.990-992, 1989.
- CIRULLI, M. ; ALEXANDER, L.J.A.** comparasion of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum f. lycopersici* and diferent sources of resistance in tomato. **Phytochemistry**, Elmsford, v.56, n.11, p.1302-1304, 1966.
- CLAYPOOL, L.L.; DAVIES, L.D.** The effect of cold and modified atmosphere storage on the canning quality of cling peaches. **Food Technology**, Chicago, v.13, n.3, p.208-212, Mar., 1959.
- CO, H.; MARKAKIS, P.** Flavonoid compounds in the strawberry fruit. **Journal of Food Science**, Chicago, v.33, p.281, 1968.
- COELHO, A.H.R.** Qualidade pós-colheita de pêssegos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, n.180, p.31-39, 1994.
- CONN, E.E.; STUMF, P.K.** Introdução à bioquímica, 4.ed. São Paulo: Edgar Blücher, 1980. 525p.
- X **CONWAY, W.S.; SAMS, C.E.** Calcium infiltration of golden delicious apples and its effect on decay. **Phytopatology**, St.Paul, v.73, n.7, July, 1983.
- X **CONWAY, W.S.; SAMS, C.E.** Possible mechanism by which postharvest calcium treatment reduces decay in apples (*Malus domestica*, inoculated with *Penicilium expansum*. **Phytopatology**, St.Paul, v.74, n.2, p.208-210, 1984.
- COOPER, J.B.; VARNER, J.E.** Insolubilization of hydroxiprolin-rich cell wall glycoprotein in aereted carrot roots slices. **Biochemical and Biophysical Reseach Communications**, San Diego, v.112, p.161-167, 1983.
- DEAN, B.B.; KOLATTUKUDY, P.E.** Synthesis of suberin during wound healing in jade leaves tomato fruit and bean pods. **Plant Physiology**, Washington, v.58, p.411-416, 1976.

- DE VRIES, J.A.; ROMBOUTS, F.M.; VORAGEM, A.G.J.; PILNIK, W.  
Distribution of methoxyl groups in apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers*, Oxford, v.3, p.245-258, 1983.
- DE VRIES, J.A.; VORAGEM, A.G.J.; ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W.  
Extraction and purification of pectins from alcohol insoluble solids from ripe and unripe apples. *Carbohydrate Polymers*, Oxford, v.2, p.25-33, 1981.
- DIXON, R.A.; HARRISON, M.J.; LAMB, C.J. Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.32, p.479-501, 1994.
- DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant and Molecular Biology*, Palo Alto, v.41, p.339-367, 1990.
- DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Stimulation of *de novo* synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in relation to phytoalexin accumulation in *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor-treat cell suspension culture of french bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v.586, p.453-463, 1979.
- DOHERTY, H.M., SELVEDRAN, R.R.; BOWLES, D.J. The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Physiological Molecular Plant Pathology*, London, v.33, p. 377-384, 1988.
- DUPONT, F.M.; BUSH, D.S.; WINDLE, J.J.; JONES, R.L. Calcium and proton transport in membrane vesicles from barley roots. *Plant Physiology*, Washington, v.94, p.179-188, 1990.
- ECKERT, J.W.; RATNAYAKE, M. Host-pathogen interactions in postharvest diseases. In: Lieberman, M. (ed.). *Post-harvest physiology and crop preservation*. Plenum, 1993.
- ENGLISH, P.D.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. I.A. Correlation between a galactosidase production and virulence. *Plant Physiology*, Washington, v.44, p.217-224, 1969.

- ESKIN, N.A.M.** *Plant pigments, flavors and texture : the chemistry and biochemistry of select compounds*, New York: Academic Press, New York, 1979, 219p.
- ESPELIE, K.E.; FRANCESCHI, V.R.; KOLATTUKUDY, P.E.**  
Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiology*, Washington, v.81, p.487-492, 1986.
- EVANS, D.E.** Calmodulin-stimulated calcium pumping ATPases located at higher plant intracellular membranes: a significant divergence from other eucaryotes. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.90, n.2, p.420-426, Feb, 1994.
- EVANS, D.E.; BRIARS, S.A.; WILLIAMS, L.E.** Active calcium transport by plant cell membranes. *Journal of Experimental Botany*, London, v. 236, p.286-303, 1991.
- FARMER, E.E.** Effects of fungal elicitor on lignin biosynthesis in cell suspension cultures of soybean. *Plant Physiology*, Washington, v.78, p.338-342, 1985.
- FELLE, H.** Auxin oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta*, Berlin, v.174, p.495-499, 1988.
- FERGUSON, I.B.; DROBAK, B.K.** Calcium and the regulation of plant growth and senescence. *Hortscience*, Alexandria, v.23, n.2, Apr, 1988.
- FILGUEIRAS, H.A.C.** *Bioquímica do amadurecimento de tomates híbridos heterozigóticos no loco "Alcobaça"*. Lavras, UFLA, 1996. 118 p. (Dissertação de Doutorado em Ciência dos Alimentos).
- FILHO, A.B.F.; AMORIM, L.** *Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico*. São Paulo: Agronômica Ceres: 1996. 289p.
- FISHER, M.; ARRIGONI, E.; AMADO, R.** Changes in pectin substances of apples during development and postharvest ripening part 2: Analysis of the pectin fractions. *Carbohydrate Polymers*, London, v.25, p.167-175, 1994.

- FLURKEY, W.H.; JEN, J.** Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. **Journal of Food Science, Chicago**, v.43, p.1826-1828, 1978.
- FLURKEY, W.H.; JEN, J.** Purification of peach polyphenol oxidase in a presence of added protease inhibitors. **Journal of Food Science, Chicago**, v.4. n.1, p.29-41, 1980.
- FORTES, J.F.** Controle de *Monilinea fruticola* (Wint.) Honey tolerante ao Benomil. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9**, Campinas, 1987. Anais... Campinas: SBF, 1987. v.2, p.667-668.
- FORTES, J.F.** Controle da podridão parda do pessegueiro: tratamentos de inverno e floração. **Horti Sul, Pelotas**, v.1, n.0, 1989.
- FRIEND, J.** Lignification in infected tissue. In: Friend, D.R., Threfall, R. (eds.). **Biochemical aspects of plant: parasite relationships**. p.291-301. 1976.
- FRY, S.C.** Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto**, v.37, p.165-186, 1986.
- FRY, S.C.; ALDINGTON, S.; HETHERINGTON, P.R.; AITKEN, J.** Oligosaccharines signals aand substrates in the plant cell wall. **Plant Physiology, Washington**, v.103, n.1, Sept, 1993.
- GANGWAR, B.M.; TRIPATHILT, R.S.** A study on biochemical changes during ripening and storage of peach. **The Punjab Horticultural Journal**, v.12, n.2-3, p.89-92, 1972.
- GARROD, B.; LEWIS, B.G.; BRITAIN, N.J.; DAVIES, W.P.** Studies on the contribution of lignin and suberin to the empedance of wouleded carrot root tissue to fungal invasion. **New Patology**, v.90, p.99-108, 1982.
- GASPAR, T.H.; PENEL, C.; CASTILHO, F.J.; GREPPIN, H.A** Two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum, Copenhagen**, v.64, p.418-423, 1985.
- GÄUMANN, E.** Principles of plant infection, London: Crosby Lockwood, 1950.

- GEHRING, C.A.; WILLIAMS, D.A.; CODY, S.H.; PARISH, R.W.  
 Phototropism and geotropism in maize coleoptile are spatially correlated with increase in cytosolic free calcium. *Nature*, London, v.345, p.528-530, 1990.
- GELLI, A ; BLUMWALD, E. Calcium retrieval from vacuolar pools. *Plant Physiology*, Washigton, v. 102, n.4. 1993.
- GIACOMIN, L.T.; SZALAY, A.A.Expression of a FAL 1 promoter luciferase gene fusion in *Arabidopsts thaliana* in response to infection by phytopathogenic bacteria. *Plant Science*, Limeriick, v.116, p.59-72, 1996.
- GOLDBERG, R.; IMBERTY, A.; CHU-BA, J. Development of isoperoxidases along the growth gradient in the mung bean hypocotyl. *Phytochemistry*, Elmsford, v.25, p.1271-1274, 1986.
- GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. Structure and function of the plant cell. In: *Introduction to Plant Biochemistry*. Oxford: Pergamon Press, Cap.3. p.18-54, 1983.
- GRAHAM, M.Y.; GRAHAM, T. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp *Glycinea* wall glucan. *Plant Physiology*, Washington, v.97, n.4, Dec. 1991.
- GROSS, K.C. Biosynthesis of lignin and related monomers. *Recent Adv. Phytochemistry*, Elmsford, v.11, p.141-184, 1977.
- GROSS, K.C. Recent development on tomato fruit softing. *Postharvest News and Information*, Wallingford, v.1, p.109-112, 1990.
- GROSS, K.C.; SAMS, C.E. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry*, Elmsford, v.23, p.2457-2461, 1984.
- HAARD, N.F. Physiological roles of peroxidase in post-harvest fruits and vegetables. In: Ory, R.L.; Angelo, A.J. (eds.). *Enzymes in Food and Beverage Processing*. Washington: Amer. Chem. Soc., 1977. 143p.

- HAARD, N.F.; MARSHALL, M. Isoperoxidase changes in soluble and particulate fractions of sweet potato root resulting from injury, ethylene and black root infection. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.8, p.195, 1976.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, O. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.40, p.347-369, 1989.
- HAMMERSCHMIDT, R.; NICHOLSON, R.L. Resistance of maize to anthracnose: changes in host phenols and pigments. *Phytopathology*, St.Paul, v.67, p.251-258, 1977.
- HANSON, J.B. The function of calcium in plant nutrition. *Advances in Plant Nutrition*, v.1, p.149-208, 1984.
- HANSON, K.R.; HAVIER, E.A. Phenylalanine ammonia-lyase. *Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, New York: Academic Press, 1981. V.7, p.577-626.
- HARDING, V.K.; HEALE, J.B. Isolation and identification of the antifungal compounds accumulating in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology*, St.Paul, v.17, p.277-289, 1980.
- HAREL, E.; MAYER, A.M.; LERNER, H.R. Changes in the level of catechol oxidase and laccase activity in development peaches. *Journal of Science and Food Agricultural*, v.12, Oct, 1970.
- HARKER, F.R.; FERGUSON, I.B.; DROMGOOLE, F.I. Calcium ion transport through tissue discs of cortical flesh of apple fruit. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.74, p.688-694, 1988.
- HARKIN, J.M.; OBST, J.R. Lignification in trees indication of exclusive peroxidase participation. *Science*, Washington, v.180, p.296-298, 1973.
- HAYASHI, T. Xiloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v.40, p.139-168, 1989.

- HAYASHI, T.; MACLACHLAN, G.** Pea xyloglucan and cellulose. I. Macromolecular organization. *Plant Physiology*, Washington, v.75, p.596-604, 1984.
- HEDGDE, S.; MANESS, N.O.** Sugar composition of pectin and hemicellulose extracts of peach fruit during softening over two harvest seasons, *Journal of American Society of Horticultural Science*, Mount, v.121, n.6, p.1162-1167, 1996.
- HELSPER, J.P.F.G.; De GROOT, P.F.M.; LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F.** Phosphatidylinositol monophosphate in *Lilium* pollen and turnover of phospholipid during pollen tube extension. *Phytochemistry*, Elmsford, v.25, p.2193-2199, 1986.
- HENRY, E.W.; JENSEN, T.E.** Peroxidases in tabaco abscission zone tissue. I Fine-structural localization in cell walls during ethylene-induced abscission. *Journal of Cell Science*, Cambridge, v.13, p.591-601, 1973.
- HEPLER, P.K.; WAYNE, R.O.** Calcium and plant development. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.36, p.397-439, 1985.
- HINTON, D.M.; PRESSEY, R.** Cellulase activity in peaches during ripening. *Journal of Food Science*, Chicago, v.39, n.4, July-Aug, 1974.
- HOLLAND, N.** Conservação pós-colheita de pêssegos (cv. Biute): interação entre cálcio e temperatura, Lavras: ESAL, 1993. 116p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S.F.** Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. *Plant Physiology*, Washington, v.62, p.31-35, 1978.
- HYODO, H.; YANG, S. F.** Ethylene-enhances synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in pea seedlings. *Plant Physiology*, Washington, v.47, n.6, p.765-770, 1971.
- IRWIN, P.L.; GARASIMOWICZ, W.V.; PFEFFER, P.E.; FISHMAN, M.** <sup>13</sup>C polarization transfer studies of uronic acid polymer systems. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.33, p.1197-1201, Nov./Dec. 1985.

- ISHIHARA, A.; MIYAGAWA, H.; KUWAHARA, Y.; UENO, T.; MAYAMA, S. Involvement of  $\text{Ca}^{+2}$  ion in phytoalexin induction in oat. **Plant Science**, Limerick, v.115, p.9-16, 1996.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v.1, p.35-51.
- JANDEL SCIENTIFIC, sigma plot, Scientific Graphing Software, User's Manual. California: Jandel Cooperation, 1995. 280p.
- JEN, J.J.; KAHLER, K.R. Characterization of polyphenol oxidase in peaches grown in the southeast. **HortScience**, Alexandria, v.9, p.590, 1974.
- JOHAL, G.S.; GRAY, J. GRUIS, D.; BRIGGS, S.P. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, p.468-474, 1995. (sup., 1).
- JOHN, M.A.; DEY, P.M. Postharvest changes in fruit cell wall. **Advances in Food Research**, Orlando, v.30, p.139-193, 1986.
- JONES, T.M.; ALBERSHEIM, P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell. **Plant Physiology**, Washington, v.49, p.926-936, 1972.
- JONES, R.G.W.; LUNT, O.R. The function of calcium in plants. **Botanical Review**, v.33, p.407-426, 1967.
- JOSYLN, M.A.; PONTING, J.D. Enzyme-catalyzed oxidative browning of fruit products. **Advances. Food Research**, New York, v.3, p.1, 1951.
- KADER, A.A. Standardization and inspection of fresh fruits and vegetables. In: **KADER, A.A. Postharvest Technology of Horticultural Crops**. California: University of California, 1992. p.191-200.
- KADER, A.A.; CHORDAS, A. Evaluating the browning potential of peaches. **California Agriculture**, California, Mar./Apr. 1984.

- KE, D ; Jr. SALVEIT, M.E.** Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.76, p. 412-418, 1989.
- KEEN, N.T.; YOSHIKAWA, M.**  $\beta$ -1,3-endoglucanase from soybean reases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiology*, Washington, v.71, n.3, p.460-465, 1983.
- KEESTRA, K.; TALMADGE, K.; BAUER, W.D.; ALBERSHEIM, P.** The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular componetes. *Plant Physiology*, Washington, v.51, p.188-196, 1973.
- KIELISZEWSKI, M.J.; LAMPORT, D.T.A.** Extensin: repetitive motifs functional sites post-translational codes and phylogeny. *Plant Journal*, Oxford, n.5, p.157-172, 1994.
- KIM, J.B; CARPITA, N.C.** Changes in esterification of uronic acid groups in cell wall polyssaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant Physiology*, Washington, v.98, n.2, p.646-653, Feb. 1992.
- KIM, S.H.; TERRY, M.E.; HOOPS, P.; DAUWALDER, M.; ROUX, S.J.** Production and characterization of monoclonal antibodies to wall-localized peroxidases from corn seedlings. *Plant Physiology*, Washington, v.88, p.1446-1453, 1988.
- KNEE, M.** Properties of polygalacturonase and cell cohesion in apple fruit cortical tissue. *Phytochemistry*, Oxford, v. 17, n.5, p.1257-1260, May. 1978.
- KNEE, M.; SARGENT, J.A.; OSBORNE, D.J.** Cell wall metabolism in development strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany*, Londres, v.28, n.103, p.377-396, Apr., 1977.
- KNIGHT, M.R.; CAMPBELL, A.K.; SMITH, S.M.E; TREWAVAS, A.J.** Transgenic plant aeroquorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, London, v. 352, p.524, 1991.
- KOLATTUKUDY, P.E.** Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science*, Washington, v.208, p.990-1000, 1980.

- KOLATTUKUDY, P.E.** Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.32, p.539-567, 1981.
- KOLATTUKUDY, P.E.; DEAN, B.B.** Structure gas chromatographic measurement and function of suberin synthesized by potato tuber tissue slice. *Plant Physiology*, Washington, v.54, p.116-121, 1974.
- KOLATTUKUDY, P.E.; ESPELIE, K.E.** Biosynthesis of cutin, suberin and associated waxes. In: HIGUCHI, T. (ed.). *Biodegradation of wood components*, London: Academic Press, London, 1985. 161p.
- KOLATTUKUDY, P.E.; KÖLLER, W.** Fungal penetration of the first line. Defensive barriers of plants. In: Callow, J. A. (ed.). *Biochemical of plant pathology*. John Wiley & Sons Ltda. 1983.
- KUÉ, J.** Resistance of plants to infection agents. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto. v.20, p.337-370, 1966.
- KUÉ, J.; RUSH, J.S.** Phytoalexins. *Archives. Biochemistry and Biophysics*, San Diego, v.236, n.2, p.455-472, 1985.
- KUROSAKI, F.; NISHI, A.** Elicitation of phytoalexins production in culture carrot cells. *Physiological of Plant Pathology*, London, v.24, p.169-176, 1984.
- KUROSAKI, F.; TSURUSAWA, Y.; NISHI, A.** The elicitation of phytoalexins by  $Ca^{+2}$  and cyclic AMP in carrot cells. *Phytochemistry*, Elmsford, v.26, p.1991-1923, 1987.
- LABAVITCH, J.M.** Cell wall turnover in plant development. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.32, p.385-406, 1981.
- LAGRIMINI, L.M.** Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology*, Washington, v.84, p.438-442, 1987.
- LAGRIMINI, L.M.** Wound-induced deposition of polyphenol in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiology*, Washington, v.96, p.577-583, 1991.

- LAKSHMINARAYA, S.; SOMMER, N.F.; POLITO, V.; FORTLAGE, R.J. Development of resistance to infection by *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in wounds of mature apple fruit. *Phytopatology*, St. Paul, v.77, p.1674-1678, 1987.
- LAMB, C.J.; LAWTON, M.A.; DRON, M.; DIXON, R.A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, Cambridge, v.56, p.215-224, 1989.
- LANGE, B.M.; LAPIERRE, C.; SANDERMANN, H. Jr. Elicitor-induced spruce stress lignin. *Plant Physiology*, Washington, v.108, p.1277-1287, 1995.
- LEGENDRE, L.; HEINSTEIN, R.F.; LOW, P.S. Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *Journal Biological. Chemistry*, Bethesda, v.267, p.20140-29147, 1992.
- LEGRAND, M.; FRITIG, B.; HIRTH, L. Enzymes of the phenylpropanoid pathway and the necrotic reaction of hypersensitive tobacco mosaic virus. *Phytochemistry*, Elmsford, v.15, p.1353-1359, 1976.
- LEHNINGER, A.L. *Bioquímica: componentes moleculares das células*. 2.ed. São Paulo: Edgar Blücher, 1976. v.1.
- LIMA, L.C.O. *Tecido esponjoso em manga "Tommy Atkins": transformações químicas e bioquímicas no mesocarpo durante o armazenamento*. Lavras: UFLA, 1997. 151p. (Dissertação - Doutorado em Ciência dos Alimentos).
- LISKER, N.; KUÉ, J. Elicitors of terpenoid accumulation in potato tuber slices. *Phytochemistry*, Elmsford, v.67, p.1357-1359, 1977.
- LUDWIG-MÜLLER, J.; THERMANN, P.; PIEPPER, K.; HILGENBERG, W. Peroxidase and chitinase isoenzyme activities during root infection of Chinese cabbage with *Plasmiodiophora brassicae*. *Plant Physiology*, Washington, v.90, p.661-670, 1994.
- LUH, B.S.; PHITHAKPOL, B. Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. *Journal of Food Science*, Chicago, v.37, 1972.

- LURIE, S.; LEVIN, A.; GREVE, C.; LABAVITCH, J.M. Pectic polymer changes in nectarines during normal and abnormal ripening. *Phytochemistry*, Elmsford, v.36, n.1, p.11-17, Jan., 1994.
- LYONS, P.; WOOD, K.V.; NICHOLSON, R.L. Caffeoyl ester accumulation in corn leaves inoculated with fungal pathogens. *Phytochemistry*, Elmsford, v.29, n.1, p.97-101, 1990.
- MACGUIRE, R. G.; KELMAN, A. Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. *Phytopathology*, St. Paul, v.76, n.4, 1986.
- MADER, M. Die lokalization des peroxidase-isoenzym gruppe G1 in der Zellwand von Tabak-Gewebe. *Planta*, New York, v.131, p.11-15, 1976.
- MAIA, M.L.; AMARO, A.A; GONÇALVES, J.S.; SOUZA, S.A.M. Produção mercado de pêra e pêssego no Brasil. *Informações Econômicas*, São Paulo, v.26, n.2, p.33-48, fev. 1996.
- MALIS-ARAD, S.; DIDI, S.; MIZRAHI, Y.; KOPELIOVITCH, E. Pectin substances: changes in soft and firm cultivars and in non-ripening mutants. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.58, n.1, p.111-116, 1983.
- MANGAS, J.J.; DAPENA, E.; RODRIGUEZ, M.S.; MORENO, J.; GUTIERREZ, M.D.; BLANCO, D. Changes in pectic fractions during ripening of cider apples. *HortScience*, Alexandria, v.27, n.4, p.328-330, Apr., 1992.
- MANESS, N.; RYAN, J.D.; MORT, A.J. Determination of the degree of methyl esterification of pectin in small samples by selective reduction of esterified galacturonic acid to galactose. *Analytical Biochemistry*, New York. 1990.
- MANSFIELD, J. Recognition and response in plant/fungus interactions. In: Fraser, R.S.S. (ed.). *Recognition and response in plant-virus interactions*, Berlin: Springer-Verlag, 1990. p.31-52.
- MANSFIELD, J.W. The role of phytoalexins in disease resistance. In: *Phytoalexins*. New York: Academic., 1982, 334p. p.237-265.

- MARINOS, N.G. Studies on submicroscopic aspects of mineral deficiencies. I. Calcium deficiency in the shoot apex of Barley. *American Journal of Botany*, v.49, p.839-841, 1962.
- MASCARENHAS, H.A.A. Cálcio no solo e na planta. In: *Cálcio, Enxofre e Ferro no Solo e na Planta*. Fundação Cargil, p.1-24, 1977.
- MATERN, U.; GRIMMIG, A.; KNEUSEL, R.E. Plant cell wall reinforcement in the disease-resistance response: molecular composition and regulation. *Canadian Journal of Botany*, v.73, p.511-517, 1995. (supplement)
- MATERN, U.; KNEUSEL, R.E. Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica, Israel*, v.16, p.153-170, 1988.
- MAULE, A.J.; RIDE, J.P. Ammonia-lyase and  $\sigma$ -methyltransferase activities related to lignification in wheat leaves infected with *Botrytis*. *Phytochemistry*, Elmsford, v.15, p.1661-1664, 1976.
- MAZZAFERA, P., GONÇALVES, W.; FERNANDES, J.A.R. Fenóis, peroxidase e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. *Bragantia, Campinas*, v.42, n.2, p.131-142, 1989.
- MAYER, A.M. Plant-fungal interactions: a plant physiologists viewpoint. *Phytochemistry*, Elmsford, v.28, n.2, p.311-317, 1989.
- MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, Elmsford, v.18, n.193, 1979.
- MCCANN, M.C.; ROBERTS, K. Changes in cell wall architecture during cell elongation. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.45, p.1683-1691, 1994.
- MCCANN, M.C.; WELL, B.; ROBERTS, K. Direct visualization of cross-links in primary plant cell wall. *Journal of Cell Science*, Cambridge, v.96, p.323-334. 1990.
- MELFORD, A.J.; PRAKASH, M.D. Post-harvest changes in fruit cell wall. *Advances in Food Reserch*, New York, n.30, p.139-193, 1986.

- MENEZES, J.B. Qualidade pós-colheita de melão tipo "Galia" durante a maturação e o armazenamento. Lavras: UFLA, 1996. 157p. (Dissertação Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- MILLER, A.R. Mechanical stress-induced changes in sugar composition of cell walls from cucumber fruit tissues. *Phytochemistry*, Elmsford, v.28, n.2, p.389-392, 1989.
- MICHAN, E.J.; GROSS, K.C.; NG, T.J. Ripening and cell wallsynthesis in normal and mutant tomato fruit. *Phytochemistry*, Oxford, v.30, n.6, p.1777-1780, June, 1991.
- MOERSCHBACHER, B.M.; NOLL, U; OCAMPO, C.A.; FLOTT, B.E.; GOTTHARDT, U; WÜTEFELD, A.; REISENER, H.J. Hypersensitive lignification response as mechanism of non-host resistance of wheat against oat crown rust. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.78, p.609-615, 1990.
- MOLGAARD, P.; HELLE, R. Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. *Phytochemistry*, Oxford, v.27, n.8. p.2411-2421, 1988.
- MOLINE, H.E.; GROSS, K.C. Growth of five pathogenic fungi on cell wall-related monosaccharides. *Plant Science Letters*, Elsevier, v.33, p.15-21, 1984.
- MOON, G.J.; PETERSON, C.A.; PETERSON, R.L. Structural, chemical and permeability changes following wounding in onion roots. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.62, p.2253-2259, 1984.
- MORAES, A.L.L. Pós-colheita de frutos do pessegueiro (*Prunus persica* (L) Batsch cv. Biute): mecanismos de resistência ao ataque de *Monilinia fructicola*. Lavras, ESAL, 1992. 102p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- OGAWA, J.M.; GILPATRICK, J.D. Review of plant pathogens resistant to fungicides and bactericides. *FAO Plant Protection Bulletin*, Rome, v.25, n.3, p.97-111, 1977.

- OHGUCHI, T.; ASADA, Y.D.** Dehydrogenation polymerization products of  $p$ -hydroxycinnamyl alcohols by isoperoxidases obtained from downy mildew-infected roots of Japanese radish (*Raphanus sativus*) **Physiologia of Plant Pathology**, Copenhagen, v.5, p.183-192, 1975.
- ORR, G; BRADY, C.** Relationship of endopolygalacturonase activity to fruit softening in a freestone peach. **Postharvest Biology and Technology**, v.3, p.121-130, 1993.
- OUCHI, S.** Molecular biology of fungal host-parasite interactions. In: **Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants**. edited by Patil, S.S., Ouchi, S., Mills, D.; Vance, C. Springer-Verlag, New York, 1991. p.15-28.
- PAN, S.Q.; YE, X.S.; KUÉ, J.** Induction of chitinases in tabaco plants systemically protected against blue mold by *Peronospora tabacina* or tabaco mosaic virus. **Phytopathology**, St.Paul. v.82, p.119-123, 1992.
- PAN, S.Q.; YE, X.S.; KUÉ, J.** Relationship of  $\beta$ -1,3-glucanase and total soluble carbohydrate to the immunization of tabaco against blue mould caused by *Peronospora tabacina* (Abstr.), **Phytopathology**, St.Paul, v.79, p.1150, 1989.
- PANTASTICO, E.B.** Structure of fruits and vegetables. In: **PANTASTICO, E.B.** (ed.). **Postharvest physiology, handling and utilization of tropical fruits and vegetables**. Westport: AVI, 1975. p.1-24.
- PARK, Y.K.; SATO, H.H.; ALMEIDA, T.D.; MORETTI, R.H.** Polyphenol oxidase of mango (*Mangifera indica* var. Haden) **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.6, Nov.-Dec., 1980.
- PAXTON, J.D.** Phytoalexins - a working redefinition. **Phytopathology Zeitschrift**, Berlim, v.101, p.106-109, 1981.
- PEARCE, R.B.; RIDE, J.P.** Elicitors of the lignification response of wheat. **Annual of Applied Biology**, v.89, p.306-607, 1978.
- PENG, M.; KUE, J.** Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. **Phytopathology**, St.Paul, v.82, p.696-699, 1992.

- PERKIN, V. Influence of package on post-harvest quality of Oklahoma and Arkansas table grapes. *American Journal Enology Viticulture*, Davies, v.43, n.1, p.73-78, 1992.
- PIMENTEL, G. *Fruticultura Brasileira*. 2.ed. São Paulo, Nobel, 1975.
- POLITIS, D.J. Ultrastructure of penetration by *Colletotrichum graminicola* of highly resistant oat leaves. *Physiologia of Plant Pathology*, Copenhagen, v.8, p.117-122, 1976.
- POOVAIAH, B.W.; GLENN, G.M.; READY, A.S. N. Calcium and fruit softening: physiology and biochemistry. *Horticultural Review*, New York, v.3, p.107-153, 1988.
- POWELL, D.A.; MORRIS, E.R.; GIDLEY, M.J.; REES, D. A. Conformation and interactions of pectins. II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *Journal Molecular Biology*, New York, v.155, p.517-531, 1982.
- PRESSEY, R.; AVANTS, J.K. Solubilization of cell walls by tomato polygalacturonase: role of pectinesterase. *Journal of Food Biochemistry*, Westport, v.6, n.1, p.57-74, Mar. 1982.
- PRESSEY, R.; HINTON, D.M.; AVANTS, J.K. Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectins in peaches during ripening. *Journal of Food Science*, v.36, n.1070-1073, 1971.
- QI, X.; BEHRENS, B.X.; WEST, P.R.; MORT, A.J. Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures. *Plant Physiology*, Washington, v.198, n.4, 1995.
- RASI-CALDOGNO, F; CARNELLI, A.; MICHELIS, M.I.D. Identification of plasma membrana Ca<sup>2+</sup>-ATPase and of its autoinhibitory domain. *Plant Physiology*, Washington, v.108, p.105-113, 1995.
- REDDY, A.S.N. Calcium as a messenger in stress signal transduction. In: *Handbook of Plant and Crop Physiology*. New York: Marcel Dekker, 1995.

- REESE, E.T.; MAGUIRE, A.H.; PARRISH, F.W. Glucosidases and exo-glucanases. *Canadian Journal of Biochemistry*, Ottawa, v.46, p.25-36, 1968.
- REID, M.L.; MATHER, D.E.; ARNASON, J.T, HAMILTON, R.I.; BOLTON, A.T. Changes in phenolic constituents of maize silk infected with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.70, n.8, Aug, 1992.
- RENELT, A.; COLLING, K.; HAHLBROCK, T. e NURNBERGER, J.E. ; PARKER, W.R.; SACKS, W.R.; SCHEEL, D. Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defense. *Journal of Experimental Botany*, v.44, Suppl, p.257-268, 1993.
- REUVENI, R; SHIMONI, M. KARCHI, Z.; KUÉ, J. Peroxidase activity as a biochemical marker for resistance of muskmelon (*Cucumis melo*) to *Pseudoperonospora cubensis*. *Phytopathology*, St.Paul, v.82, n.7, 1992.
- REYES, P.; LUH, B.S. Characteristics of browning enzymes in freestone peaches. *Food Technology*, v.14, n.11, 1960.
- RIDE, J.P. Cell walls and other structural barriers in defense. In: *Biochemical Plant Pathology*, p.215-235, 1983.
- RIDE, J.P. The effect of induced lignification on resistance of wheat cell walls to fungal degradation. *Physiologia of Plant Pathology*, Copenhagen, v.16, p.187-196, 1980.
- RIDE, J.P. The role of cell wall alterations in resistance to fungi. *Annual Appl. Biol.*, v.89, p.302-306, 1978.
- RIDE, J.P.; PEARCE, R.B. Lignification and papilla formation at sites of attempted penetration of wheat leaves by non-pathogenic fungi. *Physiologia of Plant Pathology*, Copenhagen, v.15, p.79-92, 1979.
- RIDGE, I. Effects of ethylene and auxin on cell wall structure in tissue swelling. *Ann. Appl. Biol.*, v.81, p.98-101, 1975.

- 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, v.65, n.9, Sept., 1987.
- ROOD, P.** Development and evolution of objective maturity indices for California Freestone peaches. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Beltsville, v.70, p.104-112, 1972.
- RUSHING, J.W.** Identification of potencial impact-injury locations on peach and apple packing with an instrumented sphere. **Proc. Fla. State Hort. Soc.** v.108, Oct., 1995.
- RYAN, C. A.** Systemic responses to wounding. In: **KOSUGE, T.; NESTER, E.W.** (eds.). **Plant-Microbe Interactions. Molecular & Genetic Perspectives.** New York: McMillan, v.1, 1983.
- SANCHEZ-FERRER, A. BRU, R.; GARCIA-CARMONA, F.** Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. **Plant Physiology**, Washington, v.91, p.1481-1487, 1989.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P.** Análise química de plantas. Piracicaba: ESALQ. 1974. 56p.
- SCALON, S.P.Q.** Qualidade de morango: efeito do  $\text{CaCl}_2$  sobre a parede celular e níveis residuais de benomil. Lavras: UFLA, 1996. 105p. (Dissertação de Doutorado em Ciência dos Alimentos).
- SCHEEL, D; HAUFFE, K.D.; JAHNEN, W.; HAHLBROCK, K.** Stimulation of phytoalexin formation in fungus-infected plants and elicitor-treated cell cultures of parsley. In: **LUGTENBERG, B.** (ed.) **Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions.** Berlin: Springer-Verlag, 1986. p.325-331.
- SCHMELZER, E., NATON, B.; FREYTAG, S.; ROUHARA, I.; KÜSTER, B.; HAHLBROCK, E.** **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, V.73 (Suppl. 1), p.426-434, 1995.

- SELVENDRAN, R.R.; O'NEILL, M.A.** Isolation and analysis of cell wall from plant material. **Methods of Biochemical Analysis**, New York, v.32, p.25-153, 1987.
- SETHU, K.M.P.; PRABHA, T.N.; THARANATHAN, R.N.** Post-harvest biochemical changes associated with the softening phenomenon in *Capsicum annuum* fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v.42, n.4, p.961-966, 1996.
- SHARPLES, R. O.** The influence of orchard nutrition on the storage quality of apples and pear grown in the United Kingdom. In: **Mineral Nutrition of Fruit Trees**. D. Atkinson, J.E. Jackson; R.O. Sharples ; W.M. Waller, eds Butterworth's, LONDON-Boston, 1980.
- SHERF, B.A.; KOLATTUKUDY, P.E.** Developmentally regulated expression of the wound and pathogen-responsive tomato anionic peroxidase in green fruit: **Plant Journal**, Oxford, v.3, p.829-933, 1993.
- SHOWALTER, A.M.** Structure and function of plant cell wall proteins. **Plant Cell**, v.5, p.9-23. 1993.
- SIDDIQ, M.; SINHA, N.K.; CASH, J.N.** Characterization of polyphenoloxidase from stanley plums. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.5, 1992.
- SIDDIQUI, S; BANGERTH, F.** Effect of pre-harvest application of calcium on fresh firmness and cell-wall composition of apples - influence of fruit size. **Journal of Horticultural Science**, v.70, n.2, p.263-269, 1995.
- SILVA, D.J.** *Análise de Alimentos - Métodos Químicos e Biológicos*. Viçosa. UFV, 1981, 166p.
- SMIT, F.; DUBERT, I.A.** Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. **Phytochemistry**, v.44, n.5, p.811-815, 1997.
- SOUTHERTON, S.G.; DEVERALL, B.J.** Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf-rust fungus. **Plant Pathology**, California, v.39, p.223-230, 1990.
- SOUTHGATE, D.A.T.** **Determination of food carbohydrates**, London: Elsevier Applied Science, 1991, 232p.

- STAFFORD, H. A. The metabolism of aromatic compounds. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.25, p.459-486, 1974.
- STERLING, C. Physical state of cellulose during ripening of peach. *Journal of Food Science*, Chicago, v.26, n.2, Mar.-Apr., 1961.
- STOCKWELL, V.; HANCHEY, P. Effect of cuticle treatment on infection of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology Zeitschrift*, Berlin, v.114, p.6-12, 1985.
- SWINEBURNE, T.R. Quiescent infections in post-harvest disease. In: *Post Harvest Pathology of Fruits and Vegetables*, p.1, New York: Academic Press, 1983.
- TAKAHASHI, H.; JAFFE, M. J. Thigmomorphogenesis: the relationship of mechanical perturbation to elicitor-like activity and ethylene production. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.61, n.3, p.405-411, July. 1984.
- TALBOTT, L.D.; RAY, P.M. Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix, polysaccharides. *Plant Physiology*, Washington, v.98, p.369-379, 1992.
- TOBIAS, R.B.; CONWAY, W.S.; SAMS, C.E.; GROSS, K.C.; WHITAKER, B.D. Cell wall composition of calcium-treated apples inoculated with *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, Oxford, v.32, n.1, p.35-39, 1993.
- TOURINO, M.C.C. Injúria mecânica em tecidos dos tecidos dos frutos de duas cultivares de pessegueiros (*Prunus persica* (L.) Batch): mecanismos de cura de fermento. Lavras: ESAL, 1990. 83p. (Dissertação Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- TU, S.I. Equilibrium analysis of calcium binding to cell walls isolated from plant tissue. *Plant Cell Physiology*, Hamikyoku, v.35, p.519-525, 1992.
- TUZUN, S.; KUÉ, J. Induced systemic resistance to blue mold: In: MCKEEN, W.E. (ed.). *Blue mold of tobacco*, St. Paul: The American Phytopatological Society, 1989. p.177-200.

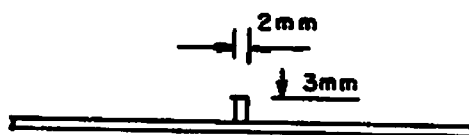
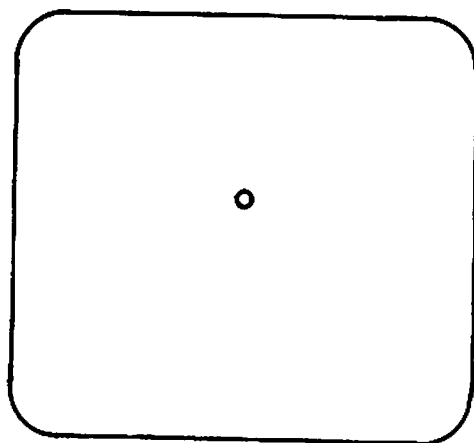
- TUZUN, S.; RAO, M.N.; VOGELIE, U.; SCHARDL, C.L.; KUÉ, J. Induced systemic resistance to blue mold: Early induction and accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanases, chitinases and other pathogenesis-related proteins (b-proteins) in immunized tobacco. *Phytopathology*, St. Paul, v.79, p.979-983, 1989.
- VALLURI, J.V.; SOLTES, E.D.J. Callose formation during wound-inoculated reaction of *Pinus elliottii* to *Fusarium subglutinans*. *Phytochemistry*, Oxford, v.29, n.1, p.71-72, 1990.
- VAN BUREN, J.P. Improved firmness without additives. *Food Engineer*, New York, v.45, n.5, p.127, 1973.
- VANCE, C.P.; ANDERSON, J.O.; SHERWOOD, R.T. Soluble and cell wall peroxidases in reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. *Plant Physiology*, Washington, v.57, p.920-922, 1976.
- VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as mechanism of disease resistance. *Annual. Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.18, p.259-288, 1980.
- VANCE, C.P.; SHERWOOD, R.T. Regulation of lignin formation in reed canary-grass in relation to disease resistance. *Plant Physiology*, Washington, v.58, p.915-919, 1976.
- VAN HUYSTEE, R.B.; ZHENG, X. Cationic peanut peroxidase and the oxidation of ferrulic acid. *Phytochemistry*, Oxford, v.34, n.4, p.933-939, 1993.
- VIGLIOLA, M.I.; CALOT, L.I. *Enfermedades en Pos Cosecha*. Buenos Aires: Hemisferio Sul, 1986. 80p.
- VINCKEN, J.P.; KEIZER, A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. *Plant Physiology*, Washington, v.108, p.1579-1585, 1995.
- VÖGELI, U.; VÖGELI-LANGE, R.E.; CHAPPELL, J. Inhibition of phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated tobacco cell-suspension cultures by calcium/calmodulin antagonists. *Plant Physiology*, Washington, n.100, p.1369-1376, 1992.

- ZÄHRINGER, U.; EBEL, J.; GRISEBACH, H. Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Elicitor-induced increase in enzyme activities of flavonoid biosynthesis and incorporation of mevalonate into glyceollin. *Archives Biochemistry and Biophysics*, San Diego, v.188, p.450-455, 1978.
- ZHENG, X.; VAN HUYSTEE, R.B. Immunological assays on the relation of culture medium peroxidases to those in fractions isolated from peanut cells. *Plant Physiology*, Washington, v.138, p.528-532, 1991.
- ZHENG, X.; VAN HUYSTEE, R.B. Peroxidase-regulated elongation of segments from peanuts hypocotyls. *Plant Science*, Limerick, v.81, p.47-56, 1992.
- WANG, C.Y.; CONWAY, W.S.; ABBOTT, J.A.; KRAMER, G.F.; SAMS, C. Postharvest infiltration of polyamines and calcium influences ethylene production and texture changes in "Golden Delicious" apples. *Journal of American Society of Horticultural Science*, v.118, n.6, p.801-806, 1993.
- WESCHE-EBELING, P.; MONTGOMERY, M. W. Strawberry polyphenoloxidase: purification and characterization. *Journal of Food Science*, Chicago, v.55, n.5, 1990.
- WHITAKER, J.R. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. New York: Marcel Dekker. 1972.
- WHITMORE, F.W. Effect of hydroxyproline on peroxidase activity in wheat coleoptiles. *Plant Physiology*, Washington, v.46, p.47, 1970. (Suppl.).
- WHITMORE, F.W. Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. *Phytochemistry*, Oxford, v.17, p.42-25, 1978.
- WISSEMANN, K.W.; LEE, C.Y. Characterization of polyphenoloxidase from variety 51 and Niagara grapes. *Journal of Food Science*, Chicago, v.46, n.2, Mar.-Apr. 1981.
- WONG, T.C.; LUH, B.S.; WHITAKER, J.R. Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of clingstone peach. *Plant Physiology*, Washington, v.48, n.1, 1971.

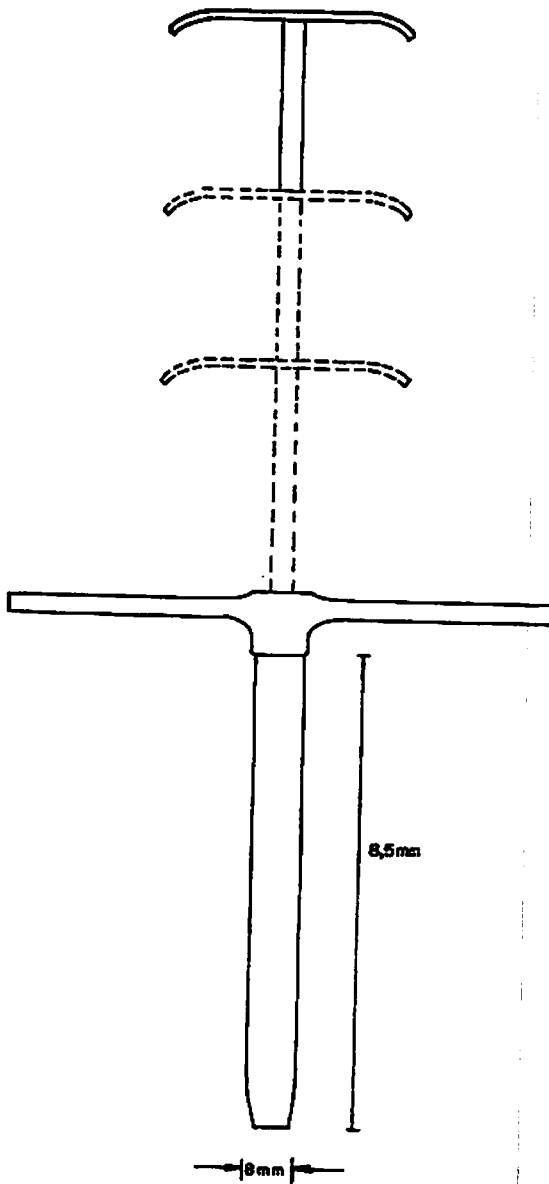
- WRITMORE, F.W.** Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. *Phytochemistry*, Oxford, v.17, p.42-25, 1978.
- WUYTACK, R.; GILLET, C.** Nature des liaisons de lion calcium la paroi de *Nitella flexilis*. *Canadian Journal of Botany*, Ontario, n.56, p.1439-1443, 1978.
- YE, X.S., PAN, S.Q.; KUÉ, J.** Association of pathogenesis-related protein and activities of peroxidase,  $\beta$ -1-3- glucanase and chitinase with systemic induced resistance to blue mold of tabaco but not to systemic tabacco mosaic virus. *Physiological Molecular Plant Pathology*, London, v.36, p.523-531, 1990.
- YOSHIOKA, H.; AOBA, K.; KASHIMURA, Y.** Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. *Journal of American Society of Horticultural Science*, Alexandria, v.117, n.4, p.600-606, 1992.
- YU, Y.B; YANG, S.F.** Biosynthesis of wound ethylene. *Plant Physiology*, v.66, n.2, Aug. 1980.

**ANEXO**

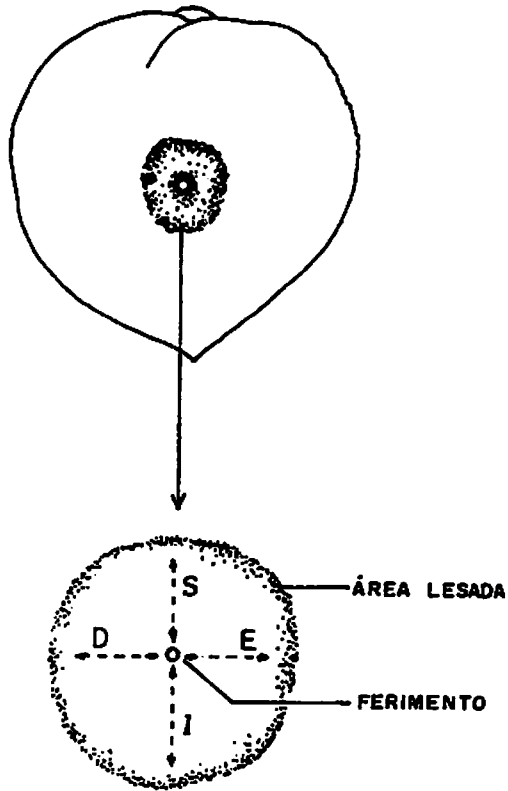
no se ha podido obtener el número de identificación de los bienes de dominio público que se encuentran en el territorio de la ciudad de Bogotá, D.C., por lo que se adjunta el presente anexo con el fin de que se pueda tener un conocimiento general de los bienes que se encuentran en el territorio de la ciudad de Bogotá, D.C., y que se encuentren en el dominio público.



**FIGURA 1.** Desenho esquemático do suporte inoxidável, contendo um estilete de 3,0mm de altura por 2mm de diâmetro, utilizado para ferir mecanicamente os frutos



**FIGURA 2.** Desenho esquemático do perfurador inoxidável apresentando 8,0mm de diâmetro, utilizado para a obtenção de discos de tecido dos frutos



**FIGURA 3.** Desenho esquemático de um pêsego, evidenciando os raios: superior (S), inferior (I), direita (D) e esquerda (E), utilizados para a avaliação da área lesionada pela *Monilinia fructicola*

**QUADRO 1.** Análise de variância para a caracterização física de pêssegos: massa do fruto (g) (MF); massa do caroço (g) (MC); relação polpa caroço (P/C); massa específica (ME); diâmetro longitudinal (cm) (DL); diâmetro transversal (cm) (DT); textura (N) (T).

Causas de Variação	GL	MF	MC	P/C	ME	DL	DT	T
Tempo	2	**	NS	NS	**	**	NS	**
Resíduo	6							
Total								
CV (%)		6,71	5,15	6,42	6,21	3,89	4,95	4,21

**QUADRO 2.** Análise de variância para a perda de massa (PM) (umidade) de pêssegos.

Causas de variação	GL	PM
Tempo	11	**
Tratamento	2	**
Tempo x Tratamento	22	ns
Resíduo	108	
Total	143	
CV (%) = 7,85		

**QUADRO 3:** Análise de análise de variância para os componentes físico-químicos de pêssegos: potencial hidrogeniônico (pH); sólidos solúveis (%) (SS), relação sólidos solúveis/acidez total titulável (SS/ATT) e químico: acidez total titulável (% ácido cítrico) (ATT).

Causas de variação	GL	pH	SS	SS/AAT	ATT
Tempo	2	**	NS	NS	NS
Resíduo	6				
Total					
CV (%)		3,05	1,81	6,59	8,18

**QUADRO 4.** Análise de variância para a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD), de discos de tecidos de pêssegos.

Causas de variação	GL	FAL	PFO	POD
Tempo	5	**	**	**
Tratamento	2	**	**	**
Tempo x Tratamento	10	**	**	**
Resíduo	36			
Total				
CV (%)		3,30	6,81	2,63

**QUADRO 5. Análise de variância para a composição de açúcares neutros totais não celulósicos de parede celular de discos de tecidos de pêssegos**

Causas de variação	GL	RHA	FUC	ARA	XIU	MAN	GAL	GLI
Tempo	4	**	**	**	**	**	**	**
Tratamento	2	NS	NS	**	NS	NS	**	**
Tempo x Tratamento	8		NS	NS	*	NS	**	**
Resíduo	30							
Total								
CV (%)		16,28	67,41	9,71	13,52	11,87	13,4	10,76

**QUADRO 6. Análise de variância para parede celular: açúcares neutros totais não celulósicos, cálcio ligado, grau de esterificação das pectinas e lignina associada de discos de tecidos de pêssegos.**

Causas de variação	GL	Açúcares neutros	Cálcio ligado	Grau de metilação	Lignina
Tempo	4	**	**	**	NS
Tratamento	2	**	**	**	**
Tempo x Tratamento	8	**	NS	**	NS
Resíduo	30				
Total					
CV (%)		4,648	5,168	8,083	18,402

**QUADRO 7.** Análise de variância para a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), polifenoloxidase (PFO), peroxidase (POD), de discos de tecidos de pêssegos inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*.

Causas de variação	GL	FAL	PFO	POD
Tempo	4	**	**	**
Tratamento	2	**	**	**
Tempo x Tratamento	8	**	**	**
Resíduo				
Total				
CV (%)		5,036	2,195	4,792

**QUADRO 8.** Análise de variância para de parede celular: açúcares neutros totais não celulósicos, cálcio ligado, grau de esterificação das pectinas, e lignina associada a parede celular de discos de tecidos de pêssegos inoculados com esporos de *Monilinia fructicola*.

Causas de variação	GL	Açúcares neutros	Cálcio ligado	Grau de metilação	Lignina
Tempo	4	**	**	NS	**
Tratamento	2	**	**	NS	NS
Tempo x Tratamento	8	**	**	NS	NS
Resíduo	30				
Total					
CV (%)		4,645	2,683	14,972	4,906

**QUADRO 9. Análise de variância da área dos pêssegos lesionada pela *Monilinia fructicola***

Causas de variação	GL	Área lesionada
Tempo	2	**
Tratamento	2	**
Tempo x Tratamento	4	**
Resíduo	27	
Total		
CV (%) = 1,108		

**QUADRO 10. Análise de variância do índice de doença de pêssegos infectados com esporos de *Monilinia fructicola***

Causas de variação	GL	Resistência
Tempo	2	**
Tratamento	2	**
Tempo x Tratamento	4	**
Resíduo	27	
Total		
CV (%) = 40,849		