

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia

Agroindustrial



TESE

**LANOSIDADE EM FRUTOS DE PÊSSEGO: ASPECTOS FISIOLÓGICOS,
MOLECULARES E TECNOLÓGICOS**

Marcio Roggia Zanuzo

Pelotas, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCIO ROGGIA ZANUZO

LANOSIDADE EM FRUTOS DE PÊSSEGO: ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MOLECULARES E TECNOLÓGICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Orientação

Cesar Valmor Rombaldi-UFPel

Jorge Adolfo Silva-UFPel

Clement Vigneault- CRDH-Canada

Marie Thérèse Charles-CRDH Canadá

Pelotas, 2007

Banca Examinadora:

Ph. D. Jorge Adolfo Silva (FAEM/DCTA/UFPel)

Ph. D. Marcos Antônio Baccarin (IB/UFPel)

Ph. D. Luciano do Amarante (IQG/UFPel)

Ph. D. Leonardo Nora (FAEM/DCTA/UFPel)

Ph. D. Luciano Lucchetta (FAEM/DCTA/UFPel)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor César Valmor Rombaldi, pela orientação, confiança, oportunidade e companheirismo na realização deste trabalho.

Aos amigos, Fernando Zocche, Cláudio Rafael Kuhn, Heloísa, Miriane, Joseana, Simone Simionatto, Sibeles Borsuck, Marciano Lucchetta, Luiz Fernando Sima pelo convívio e companheirismo durante a execução do trabalho.

Aos estagiários e bolsistas, Camila Pegoraro, Joceani Dal Cero, Jocleita Ferrareze, pelo apoio na execução dos experimentos.

Aos Professores Wladimir Padilha, Jorge Adolfo Silva, Celso Fagundes Medina, Pedro Luiz Antunes, Moacir Cardoso Elias e Valdecir Carlos Ferri pela atenção dispensada.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia, resultado do esforço conjunto dos professores deste departamento.

Aos meus pais, Vanir José Ceolin Zanuzo e Doralice Roggia Zanuzo, e a minha irmã Vanívia Roggia Zanuzo, pela paciência, carinho, incentivo e amor em todos os momentos.

À CAPES pela concessão das bolsas de estudos no Brasil e exterior pelo programa "sandwich".

Aos Orientadores no exterior Clément Vigneault e Marie Thérèse Charles pela hospitalidade e atenção em poder desenvolver parte do doutorado junto ao CRDH (Centre de recherche et de développement en horticulture) no Canadá.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia nas Pessoas do Prof. Odir Dellagostin, Sibeles Borsuck e Prof^o Aleixo pelo apoio na execução dos trabalhos.

Ao grande amigo Luciano Lucchetta pela paciência, compreensão e companheirismo durante a execução do trabalho.

RESUMO

ZANUZO, Marcio. **LANOSIDADE EM FRUTOS DE PÊSSEGO: ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MOLECULARES E TECNOLÓGICOS 2007. 75f. Tese (Doutorado)** - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Neste trabalho, na primeira etapa, confirmou-se a hipótese de que tratamentos que estimulam a atividade poligalacturonase (PG) (aquecimento intermitente e etileno) e/ou que diminuem a atividade pectina metil esterase (PME) (atmosfera controlada (AC)) contribuem para prevenir a lanosidade. As baixas temperaturas durante a atmosfera refrigerada (AR) constitui-se em bom método para redução da atividade PG, mas não é suficiente para o controle da atividade da PME, favorecendo a ocorrência da lanosidade. O 1-MCP (1-metil ciclo propano), potente inibidor da ação do etileno, age mais no controle da PG do que da PME, também estimulando a ocorrência desse distúrbio. Como alguns métodos que previnem a lanosidade, como a AC, aquecimento intermitente e etileno, não tem sido facilmente adotados pelos produtores, testou-se tratamentos com ácido giberélico (AG_3), na pré-colheita como forma de retardar-se a colheita dos pêssegos "Chiripá". Tal fato não ocorreu, mas os frutos tratados com esse fitoregulador no início da fase de endurecimento do caroço apresentaram maior tamanho por ocasião da colheita, e menores percentuais de lanosidade após o AR. A causa desse comportamento não foi demonstrada, mas observou-se que houve maior equilíbrio da atividade PG e PME, corroborando com a hipótese do experimento anterior. Para melhor monitorar os eventos relacionados as enzimas PG e PME, além dos ensaios enzimáticos e moleculares, produziram-se anticorpos policlonais anti-PG e anti-PE onde foram testados pela técnica de *Western blot*. Esses anticorpos foram capazes de reconhecer especificamente as proteínas recombinantes e também as proteínas em pêssegos da cultivar chiripá.

Palavras-chave: Pêssego, PG, PME, Ácido giberélico (AG_3), lanosidade, 1-MCP, aquecimento intermitente, atmosfera controlada (AC), atmosfera refrigerada (AR).

ABSTRACT

ZANUZO, Marcio, R. WOOLINESS IN PEACH FRUITS: PHYSIOLOGICAL, MOLECULAR AND TECHNOLOGICS ASPECTS

In this study, in the first step, was confirmed hypothesis that stimulates PG activity treatments (Intermittent warming and ethylene) and/or decrease PME activity (Controlled atmosphere (CA)) contribute to wooliness prevention. The low temperature during refrigerated atmosphere (RA) conditions, become a good methods to reduce PG activity, but it is not sufficient to control PE activity, improving wooliness occurrence. The 1-MCP (1-Methylcyclopropene), potent inhibitor ethylene action, act more in PG control than PME, also stimulating this disturb occurrence. How any methods improve wooliness, as CA, intermittent warming and ethylene, not have been easily adopted by farmers, tried to treatments with AG₃ (giberellic acid) on pré-harvest to delay harvest from “Chiripá” peaches. In fact, this did not happen, but treated fruits with this growth regulator in the beginning of hardening pit, showed bigger size on harvest ocasion, and lower index wooliness after RA conditions. The cause of this behaviour was not showed, but it was observed that there was more balance of PG and PME activity, corroborating with the last experiment hypothesis. For better checking the events related to PG and PME enzymes, beyound of enzymatic and molecular assays, produced policlonal antibody anti-PG and anti-PME. These antibodies were able to recognize especifically recombinant proteins and also “chiripá”peach proteins.

Key-words: “Chiripá”peaches, PG’s, PME’s, Giberellic acid (AG₃), Wooliness, Intermittent warming, Refrigerated atmosphere, Controlled atmosphere

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA II—1** - CURVA DE CRESCIMENTO DE FRUTOS CONTROLE E TRATADOS DE PÊSSEGOS CV. 'CHIRIPÁ' COM AG₃ NO INÍCIO DA FASE DE ENDURECIMENTO DO CAROÇO (T1) (FASE ESTACIONÁRIA) E NA FASE DE CRESCIMENTO APÓS O ENDURECIMENTO DO CAROÇO (T2) (FASE EXPONENCIAL). AS BARRAS VERTICAIS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO DA MÉDIA. (N= 100)..... 31
- FIGURA II—2** - ATIVIDADE POLIGALACTURONASE (PG) (VISCOSIDADE RELATIVA.MG PROTEÍNA⁻¹.H⁻¹) E PECTILMETILESTERASE (PME)(MILIEQUIVALENTESH⁻¹.MG PROTEÍNA⁻¹.H⁻¹) EM PÊSSEGOS CV. 'CHIRIPÁ' TRATADOS E NÃO TRATADOS COM AG₃ À CAMPO NO INÍCIO DA FASE DE ENDURECIMENTO DO CAROÇO (AG₃-T1) E NA FASE DE CRESCIMENTO APÓS O ENDURECIMENTO DO CAROÇO (AG₃-T2) DURANTE A COLHEITA. 33
- FIGURA III—1**- PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO DOS CLONES DE DNA (CDNA) DAS ENZIMAS PG, PE E EXP EM GEL DE AGAROSE A 1% (M/V) UTILIZANDO A TÉCNICA DE RT-PCR. PISTA 1- MARCADOR *Λ*/HINDIII; PISTA 2- MARCADOR DNA LADDER 1KB; PISTA 3- POLIGALACTURONASE (PG); PISTA 4- PECTINESTERASE (PE); PISTA 5- EXPANSINA (EXP). AS SETAS INDICAM O TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS. 54
- FIGURA III—2** - PRODUTO DA DIGESTÃO DO PLASMÍDEO TOPO-TA CONTENDO OS CDNAS PG, PE E EXP, COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *BAM*HI E *KPM*I. PISTA 1- MARCADOR DNA LADDER 1KB; PISTA 2- PTOPO PG, PISTA 3- PTOPO PE; PISTA 4- PTOPO EXP. 54
- FIGURA III—3** - PRODUTO DA PURIFICAÇÃO DOS CLONES PG, PE E EXP, UTILIZANDO O KIT GFX™ (AMERSHAM BIOSCIENCE®). PISTA 1- MARCADOR DNA LADDER 1KB; PISTA 2- PG; PISTA 3- PE; PISTA 4- EXP. 55
- FIGURA III—4** - CARTA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO PAE CONTENDO OS SÍTIOS DE INSERÇÃO DOS CDNAS. 56
- FIGURA III—5** - PRODUTO DA DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PAE CONTENDO OS CDNAS PG, PE E EXP. PISTA 1- PLASMÍDEO PAE EXP; PISTA 2- PLASMÍDEO PAE EXP DIGERIDO; PISTA 3- PLASMÍDEO PAE PG; PISTA 4- PLASMÍDEO PAE PG DIGERIDO; PISTA 5- PLASMÍDEO PAE PE; PISTA 6- PLASMÍDEO PAE PE DIGERIDO; PISTA 7- PLASMÍDEO PAE LINEARIZADO. 56
- FIGURA III—6** - EXPRESSÃO PROTÉICA EM SDS-PAGE 12% DE *E. COLI* BL21 PLYSS (D3) CONTENDO O PLASMÍDEO PAE COM OS CLONES PG, PE E EXP EM PISTA 1- MARCADOR CASEIRO; PISTA 2 E 3- EXPRESSÃO PAE PG; PISTA 4 E 5- EXPRESSÃO PAE PE; PISTA 6 E 7- PAE EXP; PISTA 8- EXPRESSÃO *E. COLI* BL 21 PLYSS (D3). 57
- FIGURA III—7** - PRODUTO DA PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PG, PE E EXP EM SDS-PAGE 12%. PISTA 1- MARCADOR MOLECULAR; PISTA 2- MARCADOR BENCH MARK PROTEIN LADDER (INVITROGEN®); PISTA 3- CLONE *E. COLI* PLYSS BL 21 PAE PG; PISTA 4- PG RECOMBINANTE PURIFICADA; PISTA 5- *E. COLI* PLYSS BL 21 PAE EXP; PISTA 6- EXP RECOMBINANTE PURIFICADA; PISTA 7- *E. COLI* PLYSS BL 21 PAE PE; PISTA 8- PE RECOMBINANTE PURIFICADA; PISTA 9- *E. COLI* PLYSS BL 21 PAE. 57
- FIGURA III—8** – IMUNODETECÇÃO POR *WESTERN BLOT* DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PG, PE E EXP, COM O USO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-CAUDA POLIHISTIDINA CONJUGADOS COM PEROXIDASE (SIGMA). PISTA 1- MARCADOR BENCH MARK PROTEIN LADDER; PISTA 2- PG RECOMBINANTE; PISTA 3- EXP RECOMBINANTE; PISTA 4- PE RECOMBINANTE; PISTA 5- MARCADOR ANTI-HISTIDINA. 58
- FIGURA III—9** – IMUNODETECÇÃO POR *WESTERN BLOT* COM O USO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-POLIGALACTURONASE (PG) DURANTE A MATURAÇÃO DE PÊSSEGOS. NA PARTE SUPERIOR SÃO INDICADOS OS DIAS APÓS A COLHEITA E A PROTEÍNA RECOMBINANTE (PG_R). 60
- FIGURA III—10** - IMUNODETECÇÃO POR *WESTERN BLOT* COM O USO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PECTINESTERASE (PE) DURANTE A MATURAÇÃO DE PÊSSEGOS. NA PARTE SUPERIOR SÃO INDICADOS OS DIAS APÓS A COLHEITA E A PROTEÍNA RECOMBINANTE (PE_R). 60
- FIGURA III—11** – IMUNODECÇÃO DE PG (A) E DE PE (B), E OCORRÊNCIA DE LANOSIDADE EM PÊSSEGOS "CHIRIPÁ" ARMAZENADOS POR 30 DIAS EM ATMOSFERA REFRIGERADA (AR) E MANTIDOS POR 0, 2, 4, 6 E 8 DIAS EM TEMPERATURA AMBIENTE (23±2°C). A PROTEÍNA RECOMBINANTE (R) ESTA INDICADA NA FIGURA. 62
- FIGURA III—12** – IMUNODECÇÃO DE PG (A) E DE PE (B), E OCORRÊNCIA DE LANOSIDADE EM PÊSSEGOS "CHIRIPÁ" ARMAZENADOS POR 30 DIAS EM A TMSFERA CONTROLADA (2

KPA DE O ₂ E 5 KPA DE CO ₂) E MANTIDOS POR 0, 2, 4, 6 E 8 DIAS EM TEMPERARURA AMBIENTE (23±2 °C).	63
FIGURA III—13 – IMUNODECÇÃO DE PG (A) E DE PE (B), E OCORRÊNCIA DE LANOSIDADE EM PÊSSEGOS ARMAZENADOS POR 30 DIAS EM ATMOSFERA REFRIGERADA COM APLICAÇÃO DE AG ₃ , MANTIDOS POR 0, 2, 4, 6 E 8 DIAS EM TEMPERARURA AMBIENTE (23±2 °C).....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA II—1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS NO MOMENTO DA COLHEITA DE PÊSSEGOS CV. 'CHIRIPÁ' TRATADOS COM AG ₃ NO INÍCIO DA FASE DE ENDURECIMENTO DO CAROÇO (T1) (FASE ESTACIONÁRIA) E NA FASE DE CRESCIMENTO APÓS O ENDURECIMENTO DO CAROÇO (T2) (FASE EXPONENCIAL) EM RELAÇÃO AO CONTROLE (SEM AG ₃).....	32
TABELA II—2 - OCORRÊNCIA DE LANOSIDADE (%) EM PÊSSEGOS 'CHIRIPÁ', ARMAZENADOS POR 30 DIAS EM AR A 0°C E MANTIDOS EM TEMPERATURA DE 23±3°C POR 6, 24, 48 E 72 HORAS. ESSES FRUTOS FORAM TRATADOS NO CAMPO COM AG ₃ NO INÍCIO DA FASE DE ENDURECIMENTO DO CAROÇO (T1) E NA FASE DE CRESCIMENTO APÓS O ENDURECIMENTO DO CAROÇO (T2), SENDO COMPARADOS COM O CONTROLE (SEM AG ₃).	34
FIGURA II—3 - ATIVIDADE POLIGALACTURONASE (PG) (A) E PECTILMETILESTERASE (PME) (B) EM PÊSSEGOS CV. 'CHIRIPÁ' TRATADOS E NÃO TRATADOS COM AG ₃ À CAMPO ARMAZENADOS POR 30 DIAS EM AR A 0°C E MANTIDOS POR 6, 24, 48 E 72 HORAS EM TEMPERATURA DE 23±3 °C NO INÍCIO DA FASE DE ENDURECIMENTO DO CAROÇO; FASE ESTACIONÁRIA (T1) E NA FASE DE CRESCIMENTO APÓS O ENDURECIMENTO DO CAROÇO; FASE EXPONENCIAL (T2) E CONTROLE (SEM AG ₃).	35
TABELA III—1 - DESCRIÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO EM PCR DOS GENES DA POLIGALACTURONASE, PECTINESTERASE E EXPANSINA COM OS RESPECTIVOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO PARA <i>BAMHI</i> E <i>KPMI</i>	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
ARTIGO I.....	15
EFFECT OF ETHYLENE, INTERMITTENT WARMING AND CONTROLLED ATMOSPHERE ON POSTHARVEST QUALITY AND THE OCCURRENCE OF WOOLLINESS IN PEACH (<i>PRUNUS PERSICA</i> CV. CHIRIPÁ) DURING COLD STORAGE.....	16
Abstract	16
1-Introduction	17
2-Materials and Methods	18
2.1- Harvest	18
2.2- Treatments.....	18
2.3- Evaluations.....	18
2.4- Experimental design and stasticstical analysis.....	19
3- Results and discussions.....	19
4- Conclusions.....	23
5- References.....	23
 ARTIGO II.....	 24
EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE A QUALIDADE E LANOSIDADE DE PÊSSEGOS CONSERVADOS SOB REFRIGERAÇÃO	24
Resumo	24
Abstract	25
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO.....	36
AGRADECIMENTOS	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
 ARTIGO III.....	 39
CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE POLIGALACTURONASE, PECTINESTERASE E EXPANSINA EM PÊSSEGOS “CHIRIPÁ” EM CONDIÇÕES QUE PREVINEM E FAVORECEM A OCORRÊNCIA DE LANOSIDADE	39
Resumo	39
Abstract	40
1 INTRODUÇÃO	41
2- Materiais e Métodos.....	43
2.2- Variáveis analisadas.....	44
2.2.1.1 – Isolamento de RNA	45
2.2.1.2- Síntese de cDNA.....	46
2.2.1.3-Transformação de células competentes de <i>E.coli</i> BL21 pLyss	49
2.2.1.4- Indução da expressão das proteínas recombinantes PG, PE e Exp no vetor de expressão pAE	50
2.2.1.5 - Purificação de proteínas recombinantes insolúveis.....	50
2.2.1.6 - Produção, caracterização e título de anticorpos policlonais.....	51
2.3 - Western blot.....	52
2.4 - Lanosidade	53
3- Resultados e discussão	53
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES	67
AGRADECIMENTOS	67
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	67
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	72

1. Introdução

Estima-se que, na última década, no Brasil, houve um incremento de 25% no consumo de frutas e hortaliças, especialmente nas formas *in natura* e sucos/néctares. Uma das causas desse comportamento está relacionada com o fato de que os consumidores vêm modificando seus hábitos alimentares e, cada vez mais, relacionam a dieta com a prevenção de doenças, buscando em frutos e hortaliças, benefícios adicionais aos nutricionais (Andreguetto & Kososki, 2005). De modo genérico, ao se conceituar qualidade de frutos, deu-se destaque àqueles atributos relacionados à aparência, como uniformidade, tamanho, formato, cor, presença ou não de defeitos e/ou danos mecânicos e estágio de maturação. Todos esses requisitos ainda vigoram como importantes, mas o conceito de qualidade vem sendo ampliado, incluindo-se atributos relacionados com o sistema de produção (proteção ao meio ambiente e ao trabalhador, inserção de mão-de-obra e tipificação), o potencial de conservação do produto, propriedades nutricionais e funcionais, e características sensoriais. Mais especificamente, nesses últimos atributos, tomam cada vez mais importância, a aparência geral, a textura, o aroma e o sabor, bem como os valores nutricionais e funcionais (Andreguetto & Kososki, 2005).

Para atender a esses aspectos de qualidade, exigidos no mercado consumidor, vale a pena destacar as estratégias que têm sido adotadas pelas instituições de pesquisa, empresas, indústrias, produtores e varejistas: a inovação na forma de oferta, aumento na vida prateleira, profissionalização da comercialização, redução de perdas pós-colheita, padronização das embalagens, acesso à informação pelo consumidor, fornecimento de especificações adicionais, monitoramento dos níveis de resíduos agrícolas, associativismo de produtores, adoção de procedimentos de colheita e pós-colheita adequados, promoção de produtos com propriedades diferenciadas. Uma ação transversal às citadas anteriormente está relacionado ao apoio a estudos direcionados à fisiologia e tecnologias pós-colheita, para compreender os fatores biológicos e abióticos envolvidos na deterioração de frutos, buscando retardar a velocidade da maturação e reduzir as perdas qualitativas e quantitativas durante e após a colheita.

É durante o estágio de maturação, incluindo a maturação propriamente dita e o amadurecimento, que os frutos desenvolvem os principais atributos de atratividade sensorial, como é o caso do gosto adocicado, redução da acidez, do amargor e da adstringência, da melhoria da textura, da pigmentação, e da emissão de aromas. É também amplamente conhecido que, paralelamente a esses eventos, há variações na qualidade nutricional e funcional dos frutos. Do ponto de vista fisiológico, a maturação e o amadurecimento são caracterizados por intensa atividade metabólica, tanto por eventos catabólicos (hidrólise do amido, de pectinas, da celulose, respiração, degradação de clorofilas, outros) quanto anabólicos (síntese de compostos aromáticos, de pigmentos hidrófilos e hidrofóbicos, de ácido ascórbico, de folatos, dentre outros) (Koning, 1994; Giovannoni, 2004; Chitarra e Chitarra, 2005).

Em pêssegos, a perda de suculência, a retenção de firmeza e o escurecimento interno durante o armazenamento refrigerado são, juntamente com a ocorrência de podridões, as principais causas de perda de qualidade sensorial nessas frutas (Artes et al. 1996; Kluge et al. 1996; Luchsinger et al. 1996; Crisosto et al. 1999; Ju et al. 2000; Zhou et al. 2001; Rombaldi et al. 2001 e 2002; Nava & Brackmann, 2002; Brackmann et al. 2003).

Em pêssegos de polpa branca, como é o caso do 'Chimarrita' e 'Chiripá', a lanosidade e a retenção de firmeza são de tal magnitude, de modo que praticamente 100% das frutas podem ser afetadas por esses problemas se colhidas em estádios menos avançados de maturação e/ou armazenados por períodos prolongados sob refrigeração (Rombaldi et al. 2001 e 2002; Nava & Brackmann, 2002; Brackmann et al. 2003). Para prolongar o período de oferta de pêssegos tem-se empregado o armazenamento refrigerado (AR). Nesse sistema as frutas conservam-se, com boa qualidade, por períodos de 15 a 20 dias. A partir daí, embora mantenham boa aparência, detecta-se uma significativa perda de suculência, seja por retenção da firmeza de polpa, seja pelo desenvolvimento da lanosidade (Rombaldi et al. 2001 e 2002; Nava & Brackmann, 2002; Brackmann et al. 2003). A lanosidade tem sido, segundo a maioria dos trabalhos realizados com 'Chiripá' (Nava & Brackmann, 2002; Rombaldi et al. 2002; Brackmann et al. 2003; Girardi et al. 2005), a principal causa de perda de qualidade e depreciação comercial dessas cultivares de polpa branca. A

perda de suculência, devido à retenção da firmeza (Ju et al. 2000) e à ocorrência de lanosidade (Artes et al. 1996; Luchsinger et al. 1996; Tonutti et al. 1998; Crisosto et al. 1999; Ju et al. 2000; Rombaldi et al. 2001 e 2002; Zhou et al. 2001; Nava & Brackmann, 2002; Brackmann et al. 2003), também têm sido citadas como distúrbio majoritário em pêssegos e nectarinas, em diferentes países produtores dessas frutas.

Embora as causas exatas desse problema não tenham sido esclarecidas, várias alternativas de armazenamento têm sido propostas para evitar-se a perda de suculência. Dentre elas, sugere-se o emprego de atmosfera controlada (AC), atmosfera modificada (AM), aquecimentos intermitentes, choques de CO₂, pré-aquecimentos (Artes et al. 1996; Luchsinger et al. 1996; Kluge et al. 1996; Crisosto et al. 1999; Obenland & Carroll, 2000; Zhou et al. 2001; Nava & Brackmann, 2002; Rombaldi et al. 2002; Brackmann et al. 2003;), dentre outros. Os resultados são variados, indicando, em alguns casos, limitações econômicas e falta de reprodutibilidade, conforme Mitchel & Crisosto (1995).

Uma das hipóteses mais aceitas sobre as causas da ocorrência da perda de suculência, seja pela retenção da firmeza de polpa, seja pela ocorrência de lanosidade, é a que associa esse problema ao descompasso de atividade da enzima Pectil Metil Esterase (PME; EC 3.1.1.11) e da Poligalacturonase (PG; EC 3.2.1.15) (Crisosto et al. 1999; Ju et al. 2000; Zhou et al. 2000). Paralelamente, outros trabalhos têm verificado que outras proteínas podem estar envolvidas na regulação do processo, como é o caso das Expansinas (EXP) (Hayama et al. 2003). Baseando-se nessas informações, acredita-se que a ocorrência de lanosidade em pêssegos armazenados em AR é causada pela maior redução da transcrição, tradução e atividade da PG do que da PME, num processo influenciado pelas EXP. A prevenção desse distúrbio pode ser obtida pela redução da expressão da PME e/ou incremento da PG.

Neste contexto, este trabalho foi estruturado em três partes:

1) Artigo publicado na revista PBT (Posharvest Biology and Technology, 38, 25-35, 2005), no qual em trabalho preliminar, que coincide com o início dessa tese, demonstrou-se que a lanosidade está relacionada com o desbalanço de atividades PG

e PME e que tratamentos que estimulam PG (etileno e aquecimento intermitente), ou que reduzem a atividade PME (AC), previnem a ocorrência de lanosidade. Nesse trabalho, também demonstrou-se que a aplicação de etileno ou aquecimento intermitente previne a lanosidade, e que a AC foi o melhor tratamento, do ponto de vista técnico, já que previne lanosidade e podridões.

2) Proposta de artigo, na qual foi verificado que a aplicação de AG₃ com o intuito de prolongar o ciclo de maturação, não se confirmou. Mas os frutos tratados com esse fitoregulador, na fase inicial de endurecimento de caroço, apontam maior tamanho no momento da colheita e menor ocorrência de lanosidade após o AR. Com as avaliações enzimáticas, verificou-se que a aplicação de AG₃ estimulou a atividade enzimática da PG e PME, mas de forma equilibrada.

3) Proposta de artigo, no qual descreve-se a obtenção, pela primeira vez, de anticorpos policlonais anti-PG, anti-PME e anti-Exp, capazes de reconhecer, além das proteínas recombinantes, a própria proteína endógena correspondente em pêssegos "Chiripá". Excetua-se desse caso os anticorpos anti-Exp em extratos protéicos desse fruto, embora os mRNA estivessem presentes, considerando-se que a proteína recombinante foi obtida a partir de cDNA produzidos de mRNAs desses pêssegos, os anticorpos assim produzidos não foram capazes de identificar a proteína endógena expansina (EXP) nesses frutos. O uso de anticorpos anti-PG e anti-PE permitiram estudar, adicionalmente à atividade enzimática, a presença de proteínas PG e PE.

Artigo I

Available online at www.sciencedirect.com
**Postharvest
Biology and
Technology**

Postharvest Biology and Technology 38 (2005) 25–33

www.elsevier.com/locate/postharvbio

Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripá) during cold storage

César L. Girardi^a, Adriana R. Corrent^b, Luciano Lucchetta^b, Márcio R. Zanuzo^b,
Tatiane S. da Costa^b, Auri Brackmann^c, Richard M. Twyman^d,
Fabiana R. Nora^e, Leonardo Nora^e, Jorge A. Silva^b, Cesar V. Rombaldi^{b,*}

^a EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700 Bento Gonçalves, RS, Brasil

^b UFPel/FAEM, Dept. Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Campus University, C.P. 354, CEP 90010-900, Pelotas, RS, Brasil

^c Universidade Federal de Santa Maria, CCR 97105900, Santa Maria, RS, Brasil

^d University of York, Dept Biology, Heslington, York, YO10 5DD Yorkshire, England

^e John Innes Centre, Department of Cell & Developmental Biology, Norwich, NR4 7UH Norfolk, England

Received 2 December 2004; accepted 19 May 2005

Abstract

The loss of quality in peach (*Prunus persica*) after harvest is associated with metabolic changes, mechanical damage, loss of pulp firmness, physiological disorders and decay. In the ‘Chiripá’ cultivar, woolliness is a major physiological process that affects the postharvest quality. For a better understanding of the development of woolliness in ‘Chiripá’ peach and to identify conditions that can prevent it, we devised several postharvest treatments consisting of cold storage (CS) either alone or in combination with the application of ethylene or 1-methylcyclopropene (1-MCP), intermittent warming or controlled atmosphere (CA) storage. We evaluated the effects of these treatments on postharvest preservation, the occurrence of woolliness and the activities of endo-polygalacturonase (endo-PG), exo-polygalacturonase (exo-PG) and pectin methylesterase (PME). Our results indicated that these treatments could modify the activities of the three enzymes, and that the induction of endo-PG and exo-PG activity and/or the repression of PME activity reduced the occurrence of woolliness. CS alone had a major effect on endo-PG and exo-PG activity but less impact on PME activity. The application of 1-MCP exacerbated this difference. Either ethylene application or intermittent warming increased endo-PG and exo-PG activities without reducing PME activity, resulting in the loss of pulp firmness and decay. Under CA storage, PME activity was effectively reduced and the activities of endo-PG and exo-PG, which were low during the treatment, dramatically increased 5 days after the end of the treatment. The overall quality of

* Corresponding author.

E-mail address: cesarvrf@ufpel.tche.br (C.V. Rombaldi).

the peaches was better preserved under CA storage alone. With this treatment, the difference between PG and PME activity narrowed and the activity of both enzymatic groups decreased. As a result, the firmness of the pulp was better preserved and the incidence of decay and woolliness decreased.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: 'Chiripá' peach; Woolliness; Postharvest; Polygalacturonases; Pectin methylesterase; Ethylene; Controlled atmosphere; Intermittent warming; Cold storage

1. Introduction

Postharvest quality losses in stored peaches are caused predominantly by metabolic changes, mechanical damage, reduction in pulp firmness, physiological disorders and decay. These losses are influenced by varietal characteristics, ripening stage at harvest, handling, harvesting and storage conditions and by the storage system (Lill et al., 1989; Lelièvre et al., 1997; Crisosto et al., 1999; Rombaldi et al., 2002). In trying to reduce such losses, researchers have sought new genotypes and have examined pre-harvest conditions, harvesting procedures, cold storage (CS), controlled atmosphere (CA) storage and the use of systems that control the production and/or the action of ethylene (Zhou et al., 2000b; Dong et al., 2001).

For peaches of the 'Chiripá' cultivar, we have previously determined the fruit maturation stage that is most suitable for harvest and CS, and the appropriate conditions for CS. During these trials, we found that premature harvest resulted in a greater incidence of woolliness after CS. For this reason, harvest should be delayed until the fruit develops a light green colour, with a hue angle of 95–105° and pulp firmness between 45 and 65 N. Even so, woolliness occurs in approximately 30–40% of the fruit after 25–35 days of CS at 0 °C and 90–95% relative humidity (RH) (Rombaldi et al., 2002). It is well known that cell wall pectolytic enzyme activities increase with the normal ripening of peach fruit. Pectin methylesterase (PME, EC 3.1.1.11) catalyzes the de-methylation of the C6 carboxylic acid group in galacturonosyl residues, whereas polygalacturonase (PG, EC 3.2.1.15) breaks down the pectin polysaccharides. Because PG needs de-esterified pectates as a substrate, PME could be necessary for optimal PG activity. Abnormal PG activity has been associated with aberrant pectin metabolism, including the accumulation of insoluble pectins in the cell wall and the occurrence of woolliness (Ben-Arie et al., 1989;

Fernández-Trujillo et al., 1998; Zhou et al., 2000b). Recently, Obenland et al. (2003) demonstrated that expansin mRNA and protein are strongly suppressed in the mealy tissue of peach fruit. They hypothesized that inhibition of expansin accumulation could limit the ability of PGs to degrade pectin and therefore promote woolliness.

In order to decrease the woolliness in peaches, the use of CA conditions is recommended (Lurie, 1992; Zhou et al., 2000b). Our results (Rombaldi et al., 2002) and also those of Nava and Brackmann (2002), in each case working with 'Chiripá' peaches produced in commercial orchards in Southern Brazil, confirmed that the use of a CA, specifically 1.5 kPa O₂ and 5 kPa CO₂, was effective in the prevention of woolliness. In contrast, 100% of the fruit showed symptoms of woolliness when maintained under CS alone. Despite the successful preservation of 'Chiripá' peaches under CA conditions, this system is not yet widely used for commercial peach production in Brazil due to operational difficulties and economic limitations.

Other investigators (Anderson and Penney, 1975; Anderson, 1982; Dawson et al., 1995; Artes et al., 1996; Obenland and Carroll, 2000) studied the use of intermittent warming during CS, with the aim of re-establishing the balance between PG and PME activities in order to prevent woolliness. On an experimental scale, the results were favourable, but there remain difficulties in the validation of this approach for commercial-scale applications.

The majority of postharvest physiological disorders in climacteric fruit are influenced, directly or indirectly, by ethylene. Several reports demonstrate that reducing ethylene production and/or action is sufficient to improve the postharvest quality of most climacteric fruit (Sisler et al., 1996; Lelièvre et al., 1997; Fan et al., 1999; Zhou et al., 2001). In some cases, however, a decrease in the production or action of ethylene induced by 1-methylcyclopropene (1-MCP), a potent inhibitor

of ethylene action (Sisler et al., 1996), can be inadequate for the improvement of postharvest quality (Dong et al., 2001; Zhou et al., 2001). Indeed, in fruit sensitive to woolliness, the loss of ethylene has a negative effect, promoting this condition (Dong et al., 2001).

In this context, we have evaluated the effects of ethylene, intermittent warming and CA on the quality of 'Chiripá' peaches after harvest, particularly focusing on the occurrence of woolliness and the activities of endo-PG, exo-PG and PME.

2. Materials and methods

2.1. Harvest

Peach fruit (*Prunus persica* cv. 'Chiripá') were harvested in Southern Brazil, in the city of Farroupilha, in January 2002. The fruit were harvested when the fruit colour was light green, the recommended stage in that region for cold storage (Rombaldi et al., 2002). Immediately after harvesting the fruit were transported to the storage unit in a truck equipped with an isothermal compartment, which had been acclimatized at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ relative humidity. The time between harvest and the initiation of our experiment was approximately 12 h.

2.2. Treatments

T1	CS at $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $90 \pm 3\%$ RH
T2	CS with the application and continuous presence of $10\text{--}15 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene during the entire CS period
T3	CS with the application and continuous presence of $10\text{--}15 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene, from the 15th day of CS
T4	CS after the application of $0.9 \mu\text{L L}^{-1}$ of 1-methylcyclopropene (1-MCP) for 24 h, at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH
T5	CS with intermittent warming for 24 h at $20 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH, from the 15th day of storage
T6	CS under controlled atmosphere (CA) conditions (1.5 kPa O_2 , 5.0 kPa CO_2)

For the implementation of treatments T2 and T3, ethylene was injected into the cold room at a final concentration of approximately $12 \mu\text{L L}^{-1}$ when established.

Thereafter, daily sampling of the cold room atmosphere was carried out to determine the concentra-

tion of ethylene, which was maintained between 10 and $15 \mu\text{L L}^{-1}$ by absorption with potassium permanganate or by subsequent injections as appropriate. For treatment T5, the refrigeration system was turned off on the 15th day of CS and the room was heated until the temperature reached $20 \pm 3^\circ\text{C}$. This temperature was maintained for 24 h and then the CS was re-established. Ethylene application in T3 and intermittent warming in T5 were performed on the 15th day of storage, based on existing data for this cultivar which show that woolliness is induced from the 14th to the 18th day of CS (Rombaldi et al., 2001). For all treatments, the period of CS was 35 days, followed by 5 extra days at $22 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH (the latter aiming to evaluate shelf-life at room temperature).

For each treatment, 10 replicates were performed, each corresponding to a box containing approximately 10 kg of fruit. The evaluations were performed immediately before the treatments started (P1), at the end of 35 days (P2), and on the fifth day at room temperature ($22 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$) after the treatments (P3). Before evaluating the fruit at P2, they were stored at $22 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ for 6 h in order to bring the fruit temperature to approximately 20°C .

2.3. Evaluations

For the analysis of pulp firmness, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), ethylene production, skin colour, woolliness, presence of decay and endo-PG, exo-PG and PME enzymatic activities, the following procedures were used. Pulp firmness was determined using a hand penetrometer (TR Fruit Test 327, Italy) with an 8-mm tip, and results expressed in Newtons (N). For each fruit, two readings were taken in the equatorial region of the fruit after the skin was removed. The readings were taken on opposite sides of the fruit. TSS was determined using a hand refractometer (ATAgo PR-100 Palette, Japan). The results were expressed in % (w/w). TA was determined by titration with NaOH (0.1N) to pH 8.1, using 10 mL of juice from 10 fruit samples. The results were expressed in cmol L^{-1} of juice.

Ethylene production was determined by gas phase chromatography using a Varian® model 3300 gas chromatograph (Shimadzu GC-2010, Japan) equipped with a 1/8 in. steel column, prepared with Porapak® and a flame ionization detector. Samples consisting

of approximately 10 peaches were placed in a 600-mL hermetically closed container and maintained at $22 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH. After 1 h, 1 mL of the atmosphere in the container was sampled to determine the ethylene concentration. The results were expressed in $\text{nL g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Skin colour was measured with a Minolta CR-300 colorimeter and expressed in hue values. Woolliness was evaluated visually. Fruit that did not release juice when pressed by the fingers were considered to have the condition. The results were expressed as a percentage. Decay was also evaluated visually and expressed as a percentage. After the 35-day evaluation, decayed fruit were eliminated from the samples and the second evaluation was made by calculating the percentage of decayed fruit in relation to the total number of fruit in the samples at that time. Exo-PG, endo-PG and PME activities were determined exactly as described by Zhou et al. (2000a).

2.4. Experimental design and statistical analysis

Experiments were performed in a completely randomized manner, with 10 replicates. The experimental unit was a box containing approximately 10 kg of peaches. The percentage data for the variables woolliness and decay were normalized according to the equation $f(x) = \arcsine\sqrt{x}$. ANOVA was performed using the *F* test with a 5% significance level. Means of treatments were compared using the Duncan test with a 5% significance level.

3. Results and discussion

Peaches were harvested at the pre-climacteric stage, with a light green colour (*h* value of 98.45–99.25) (Fig. 1a) and a pulp firmness between 54.12 and 55.02 N (Fig. 1b), which is characterized by minimal ethylene production ($0.11\text{--}0.25 \text{ nL h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Ethylene production, colour and pulp firmness are relatively constant from year to year, showing only small variations between harvests in southern Brazil (Rombaldi et al., 2002). However, the other measurements we analyzed to monitor the fruit quality – TSS, TA, decay, woolliness, exo-PG, endo-PG and PME activities – undergo significant variation between harvests, and are especially influenced by climatic–edaphic conditions. In

the present study, the fruit were harvested at the stage recommended for 2–3-week CS of the ‘Chiripá’ cultivar (Rombaldi et al., 2002). If harvested at an earlier stage, the period of storage can be extended without significant increases in decay, but the incidence of woolliness approaches 100% and the sensory quality decreases drastically. Conversely, if the harvest is delayed, the period of storage has to be shortened to less than 15 days, otherwise significant losses in the overall quality of the fruit will occur. In addition, due to the reduction in pulp firmness to $<20 \text{ N}$, it becomes difficult to avoid mechanical damage to the fruit during handling.

After 35 days of CS, we observed a reduction in pulp firmness (Fig. 1b) under all treatments, with the most significant decrease under T5 (intermittent warming). Despite the well-characterized effect of ethylene in reducing pulp firmness, there was no significant effect on the pulp firmness of ‘Chiripá’ peaches after 35 days of CS under T2, T3 or T4, which included the application of 1-MCP. This demonstrates that the effects of ethylene on pulp firmness are not detectable during cold storage (T1–T4). In contrast, intermittent warming (T5) reduced pulp firmness.

In all the treatments, the end of the CS period (P2) was followed by maintenance at $22 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH for 5 days (P3), in order to simulate storage on shelves under realistic commercial conditions. By the end of this 5-day period, the effect of ethylene was obvious, since the pulp firmness was dramatically reduced to 10 N (T2). Similarly, but even more noticeably, the effect of intermittent warming reduced pulp firmness to 1.26 N (T5). Under the other treatments, the pulp firmness remained $>25 \text{ N}$. It was clear that the controlled atmosphere (T6) as well as the reduction of ethylene action through the application of 1-MCP (T4), led to a better preservation of the pulp firmness (Fig. 1b).

There was no significant difference in the content of total soluble solids (TSS) across all the treatments (Fig. 1c). On average, fruit with 11.30% of TSS at the time of harvest showed an increase to 13.0% after 35 days of CS. After a further 5 days at room temperature ($22 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH) the TSS content significantly increased in the fruit under T1, T4–T6 reaching 13.5%. In fruit treated with ethylene (T2 and T3), no significant further increases were observed after 5 days at room temperature. Increasing TSS content in peaches harvested at the pre-climacteric stage is normal

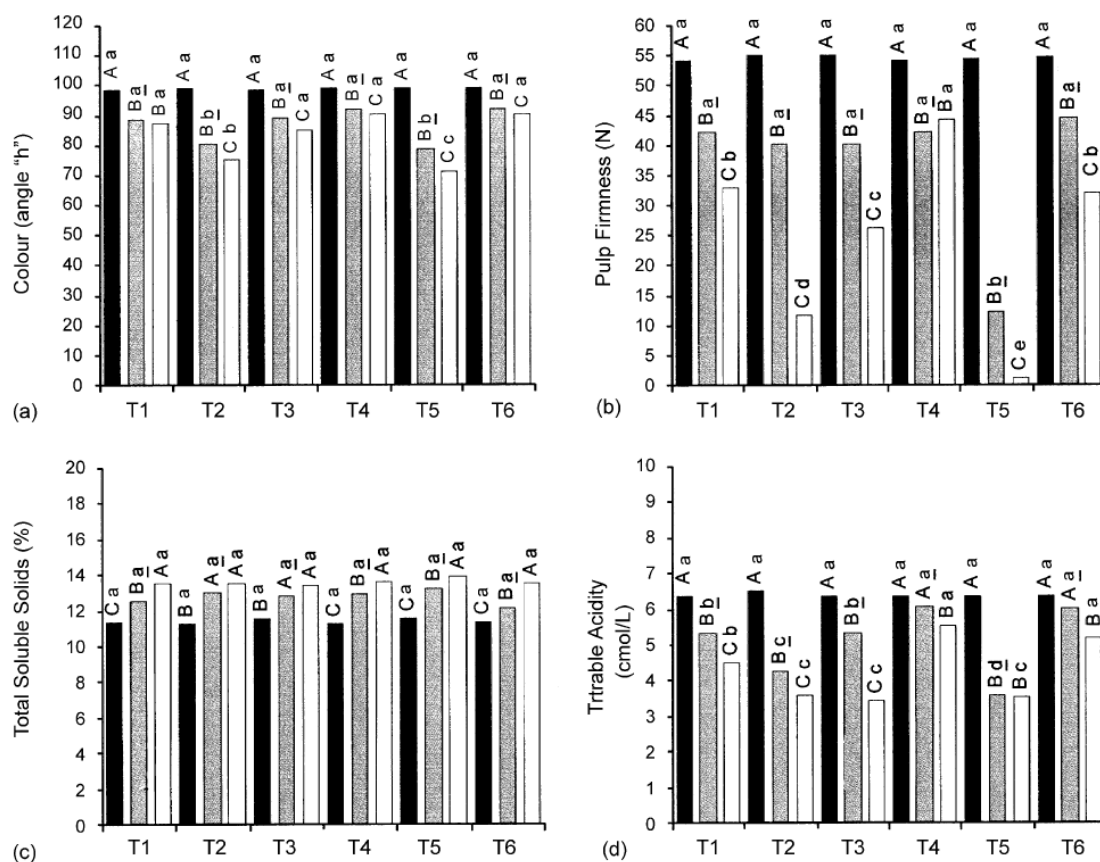


Fig. 1. Colour, pulp firmness, total soluble solids and titrable acidity in 'Chiripá' peaches under six different cold storage treatments (T1-T6), analysed over three different periods (P1-P3). The results, means of 10 replicates, were compared by Duncan's test ($p > 0.05$). Results for the same treatment and different periods do not differ from each other if the capital letter on top of the columns is the same. Results for the same period and different treatments do not differ from each other if the lower case letter on top of the column is the same. (■) Period 1 (P1): immediately before treatment started; (▒) period (P2): at the end of 35 days of treatment; (□) period 3 (P3): on the fifth day at room temperature ($22 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH) after the treatment. T1: cold storage (CS) at $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $90 \pm 3\%$ of relative humidity (RH); T2: CS with the application and the maintenance of $10\text{--}15 \mu\text{L L}^{-1}$ of ethylene; T3: CS following the application and the maintenance of $10\text{--}15 \mu\text{L L}^{-1}$ of ethylene from 15th day of storage; T4: CS following the application of $0.9 \mu\text{L L}^{-1}$ of 1-MCP at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH, for 24 h; T5: CS with intermitting warming of 24 h at $20 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH, on the 15th day of storage; T6: CS with controlled atmosphere (CA) at 1.5 kPa of O_2 and 5 kPa of CO_2 .

and reflects the solubilization and synthesis of carbohydrates (Lelièvre et al., 1997).

The titratable acidity (Fig. 1d) of the peaches decreased during the storage period, but the magnitude of the effect depended on the treatment. The largest reductions were observed in peaches treated with exogenous ethylene (T2 and T3) and in peaches subjected to intermittent warming (T5). For most of the fruit, a reduction in the level of TA is normal and the rate of reduction is directly proportional to the temper-

ature, which first affects ethylene production and then respiratory activity. This explains the more significant reductions in TA in peaches treated with ethylene (T2 and T3) and in those exposed to increased temperature (T5). This also explains the higher TA of peaches stored in the presence of 1-MCP (T4) in comparison to those under CS alone (T1). The protective effect of 1-MCP, inhibiting the action of ethylene, reduces the respiratory activity and, consequently, reduces the catabolism of organic acids.

Ethylene production (Fig. 2a), which was about $0.22 \text{ nL g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at the beginning of the experiment (P1), increased under all the treatments during the 35 days of CS. The largest increases were observed in treatments that stimulated ethylene biosynthesis, i.e. the application of exogenous ethylene (T2 and T3), which induces a positive feedback loop in which more ethylene is produced, and thermal stimulation (T5). Low temperatures are more effective in controlling ACC oxidase than ACC synthase activity (Lelièvre et al., 1997). The lowest increases were observed in peaches treated with 1-MCP, where this positive feedback loop was interrupted.

Following CS, during the 5-day period at room temperature (P3), ethylene levels in the different experimental treatments either remained the same, decreased or increased (Fig. 2a). We found that the senescence phase began under the T2 and T5 treatments, characterized by a decrease in ethylene production. For the other treatments, ethylene production was stable (T1, T4 and T6) or increased (T3), indicating that the fruit had a greater biological integrity. The application of 1-MCP, blocking the action of ethylene, inhibited synthesis after CS. Similar behaviour was reported by Dong et al. (2001) in 'Flavortop' nectarines.

As was the case for ethylene production, fruit colour was also influenced by the storage conditions (Fig. 1a). The greatest change in colour occurred in peaches treated with ethylene throughout the CS period (T2) and in those subjected to intermittent warming (T5), since variation in the background colour of the 'Chiripá' cultivar is due mainly to chlorophyll degradation. In fruit with lower ethylene production, the colour changed to a lesser degree, i.e. under treatments T4 (1-MCP) and T6 (CA). Similar results have been reported for other fruit and vegetables in which the greenish colour was preserved with the increase in CO_2 concentration and/or a reduction in O_2 levels sometimes associated with the application 1-MCP (Lill et al., 1989; Lelièvre et al., 1997; Fan et al., 1999).

Woolliness, which is the main physiological symptom of poor postharvest quality in 'Chiripá' peaches during CS, was also affected by the treatments (Fig. 2b). For the fruit maintained under CS alone (T1), 19% woolliness was observed after 35 days (P2) and 100% woolliness was observed after the 5-day period at room temperature that followed the CS (P3). When 1-MCP was applied prior to CS (T4), the disorder was more

severe, reaching 48% when the CS period ended (P2) and 100% after the 5-day period at room temperature (P3). However, under treatments that included ethylene (T2 and T3), intermittent warming (T5) and CA with changes in O_2 and CO_2 levels (T6), woolliness was either avoided (T2, T5 and T6) or reduced (T3).

Although for the majority of fruit, the control of ethylene production and/or action increases the period of conservation and avoids physiological disorders during refrigerated storage (Lelièvre et al., 1997), in 'Chiripá' peaches this is not entirely true. Although, on one hand, the application of ethylene (T2) induced a greater loss of pulp firmness (Fig. 1b) and change in colour (Fig. 1a), on the other hand it prevented the occurrence of woolliness, the main physiological disorder of this cultivar (Fig. 2b). Several authors studying woolliness in peaches, plums and nectarines, found that this condition became apparent by the time the fruit were removed from CS and kept at $20\text{--}25^\circ\text{C}$ (Anderson and Penney, 1975; Zhou et al., 2000b; Dong et al., 2001, 2002; Rombaldi et al., 2001). Crisosto et al. (1999) noted that the induction of woolliness is dependent on cultivar, stage of maturation at harvest and storage temperature.

The use of intermittent warming during CS (T5) prevented the occurrence of woolliness (Fig. 2b). According to Anderson and Penney (1975), Dawson et al. (1995) and Artes et al. (1996), increased temperature during CS accelerates the fruit's metabolism, restoring the balance between the metabolic pathways and avoiding woolliness. However, this strategy has its limitations in commercial production, since temperature equalization and temperature monitoring is more challenging in large storage rooms. Furthermore, we observed that increases in temperature promoted decay (Fig. 2c), which affected 32% of the fruit at the end of the CS period (P2) and 53% of the remaining fruit at the end of the additional 5-day period at room temperature (P3). This alone makes the strategy economically unfeasible. However, from a technical and scientific point of view, this demonstrates that the reactivation of metabolism during CS can prevent woolliness. Further studies at the molecular level, employing 'Chiripá' peach as a model, and using the same treatments as described in this article, could provide important data in terms of the activities of genes and enzymes involved in the occurrence of this condition.

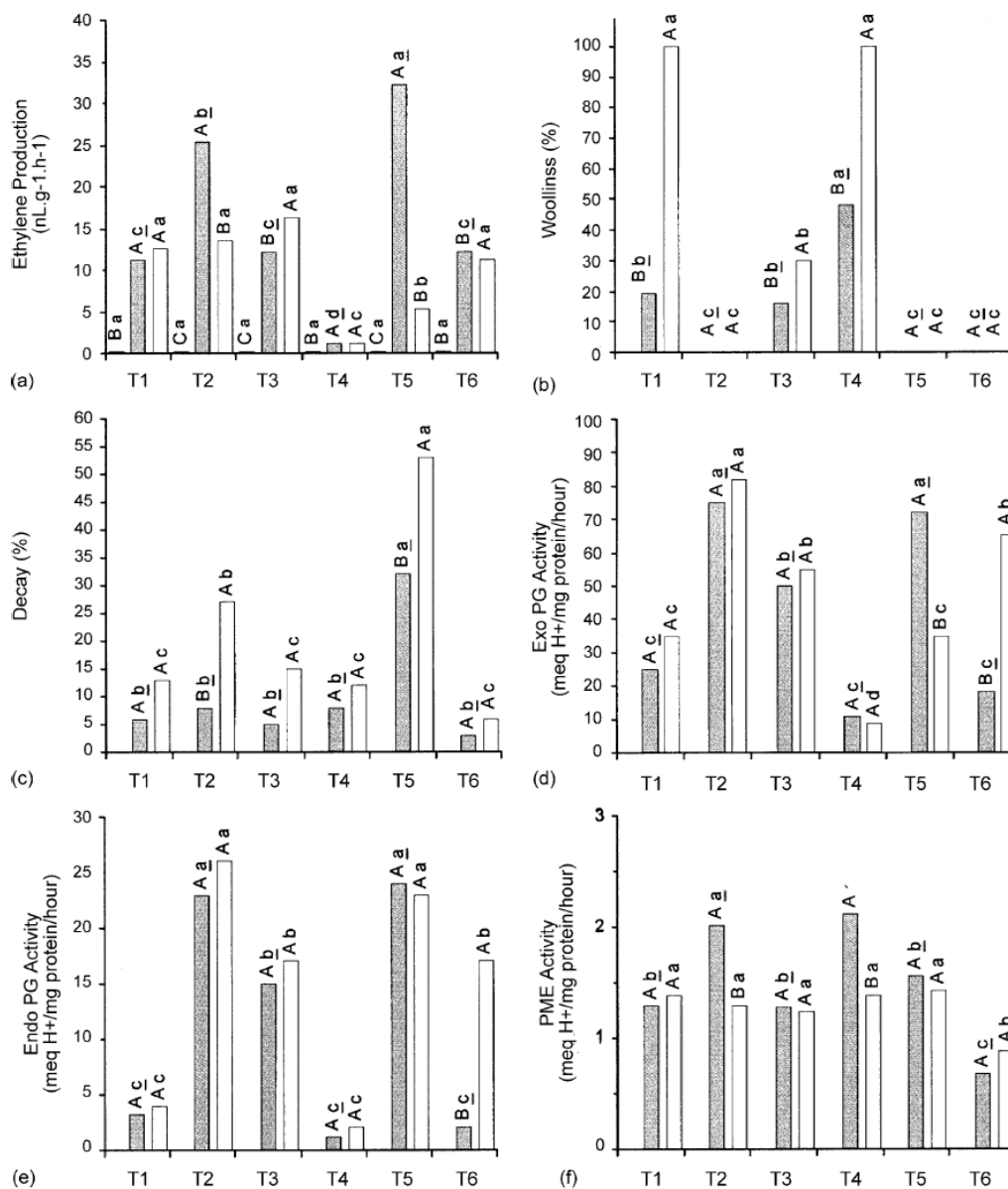


Fig. 2. Ethylene, woolliness, decay, exo-PG activity, endo-PG activity and PME activity in 'Chiripá' peaches under six different cold storage treatments (T1–T6), analysed over three different periods (P1–P3). The results, means of 10 replicates, were compared by Duncan's test ($p > 0.05$). Results for the same treatment and different periods do not differ from each other if the capital letter on top of the columns is the same. Results for the same period and different treatments do not differ from each other if the lower case letter on top of the column is the same. (■) Period 1 (P1): immediately before treatment started; (▣) period 2 (P2): at the end of 35 days of treatment; (□) period 3 (P3): on the fifth day at room temperature ($22 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH) after the treatment. T1: cold storage (CS) at $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $90 \pm 3\%$ of relative humidity (RH); T2: CS with the application and the maintenance of $10\text{--}15 \mu\text{L L}^{-1}$ of ethylene; T3: CS following the application and the maintenance of $10\text{--}15 \mu\text{L L}^{-1}$ of ethylene from 15th day of storage; T4: CS following the application of $0.9 \mu\text{L L}^{-1}$ of 1-MCP at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH, for 24 h; T5: CS with intermitting warming of 24 h at $20 \pm 3^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH, on the 15th day of storage; T6: CS with controlled atmosphere (CA) at 1.5 kPa of O_2 and 5 kPa of CO_2 .

For the other treatments (T1–T4 and T6), the percentage of fruit with decay at the end of CS did not vary significantly. However, after 5 days at room temperature (P3), there was a higher incidence of decay in peaches treated with 10–15 $\mu\text{L L}^{-1}$ of ethylene during the whole CS (T2). These fruit were more mature, characterized by reduced pulp firmness, making them susceptible to microbial infection and activity, resulting in a higher proportion of rotten fruit.

In terms of enzymatic activity (Fig. 2d–f), we observed that CS alone (T1) has a more pronounced effect controlling exo-PG and endo-PG activity than PME activity. Under the influence of 1-MCP (T4), this effect was intensified, i.e. the exo-PG and endo-PG activities were reduced further but PME activity was not affected. Ethylene application (T2 and T3) induced exo-PG and endo-PG activities but not PME activity. With respect to endo-PG and exo-PG, the highest increase was detected in fruit in which ethylene was maintained during the whole period of storage (T2). Under CA conditions (T6), there was a reduction in all three enzyme activities. These data indicate that reductions in temperature and ethylene levels have a stronger effect on endo-PG and exo-PG than on PME. However, reduction of the partial O_2 pressure and the increase in CO_2 pressure, associated with CS, decreased not only the endo-PG and exo-PG activities but also PME activity. When the enzyme assays were performed 5 days after the fruit were removed from CS, the largest increments in endo-PG and exo-PG activity occurred in fruit under T6 (CA), preventing woolliness.

‘Chiripá’ peaches are very sensitive to woolliness (Rombaldi et al., 2002), and this condition is related to an imbalance between the PG and PME activities (Zhou et al., 2000b). More specifically, it was found that woolliness in ‘Chiripá’ peaches is related to the very low endo-PG and continuous PME activities in agreement with results in other peach varieties (Artes et al., 1996). Therefore, two approaches can be used to reduce the occurrence of woolliness in this cultivar: (1) induce the activity of enzymes that are repressed in woolly peaches, i.e. endo-PG and exo-PG and/or (2) inhibit the activity of enzymes that are induced in woolly peaches, in this case PME. For the first strategy, we showed that the application of ethylene (T2 and T3) or intermittent warming (T5) stimulated endo-PG and exo-PG activity. For the second strategy, we showed that altering the balance of O_2 and CO_2 (T6) helped

to control the activity of endo-PG and exo-PG, as well as reducing PME activity. Both strategies reduced the occurrence of woolliness. However, when either ethylene or intermittent warming was applied, the prevention of woolliness was accompanied by a significant loss in the pulp firmness and more decay. For these reasons, the use of a controlled atmosphere is the more suitable strategy—this restores the balance between the two competing enzymatic groups and decreases their activity, avoiding woolliness and decay but also maintaining higher pulp firmness.

4. Conclusion

Woolliness can be avoided by the induction of endo-PG and exo-PG activities and/or by the reduction of PME activity. Treatment with ethylene, 1-MCP and intermittent warming have the greatest impact on the activities of endo-PG and exo-PG, but little effect on PME activity. In contrast, the CA treatment reduces the activities of all three enzymes and is the most suitable treatment for improving the postharvest quality of ‘Chiripá’ peaches. Neither the supply of ethylene nor intermittent warming is recommended because these encourage fruit decay and a significant loss of pulp firmness.

References

- Anderson, R.E., Penney, R.W., 1975. Intermittent warming of peaches and nectarines stored in a controlled atmosphere or air. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 100, 151–153.
- Anderson, R.E., 1982. Long-term storage of peaches and nectarines intermittently warmed during controlled-atmosphere storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 107, 214–216.
- Artes, F., Cano, A., Fernandez-Trujillo, J.P., 1996. Pectolytic enzyme activity during intermittent warming storage of peaches. *J. Food Sci.* 61 (311–313), 321.
- Ben-Arie, R., Sonogo, L., Zeidman, M., Lurie, S., 1989. Cell wall changes in ripening peaches. In: *Cell Separation in Plants*, NATO ASI series H35, pp. 253–262.
- Crisosto, C.H., Mitchell, F.G., Ju, Z.G., 1999. Susceptibility to chilling injury of peach, nectarine, and plum cultivars grown in California. *HortScience* 34, 1116–1118.
- Dawson, D.M., Watkins, C.B., Melton, L.D., 1995. Intermittent warming affects cell-wall composition of Fantasia nectarines during ripening and storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 120, 1057–1062.

- Dong, L., Zhou, H.W., Sonogo, L., Lers, A., Lurie, S., 2001. Ethylene involvement in the cold storage disorder of 'Flavortop' nectarine. *Postharvest Biol. Technol.* 23, 105–115.
- Dong, L., Lurie, S., Zhou, H., 2002. Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of 'Canino' apricots and 'Royal Zee' plums. *Postharvest Biol. Technol.* 24, 135–145.
- Fan, X.T., Blankenship, S.M., Mattheis, J.P., 1999. 1-methylcyclopropene inhibits apple ripening. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124, 690–695.
- Fernandez-Trujillo, J.P., Cano, A., Artes, F., 1998. Physiological changes in peaches related to chilling injury and ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 13, 109–119.
- Lelièvre, J.M., Latché, A., Jones, B., Bouzayen, M., Pech, J.C., 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol. Plant.* 101, 727–739.
- Lill, R.E., O'Donoghue, E.M., King, G.A., 1989. Postharvest physiology of peaches and nectarines. *Hortic. Rev.* 11, 413–452.
- Lurie, S., 1992. Controlled-atmosphere storage to decrease physiological disorders in nectarines. *Int. J. Food Sci. Technol.* 27, 507–514.
- Nava, G.A., Brackmann, A., 2002. The storing of peaches cv. Chiripá, in controlled atmosphere. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24, 328–332.
- Obenland, D.M., Carroll, T.R., 2000. Mealiness and pectolytic activity in peaches and nectarines in response to heat treatment and cold storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 125, 723–728.
- Obenland, D.M., Crisosto, C.H., Rose, J.K.C., 2003. Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches. *Postharvest Biol. Technol.* 29, 11–18.
- Rombaldi, C.V., Silva, J.A., Machado, L.B., Parussoto, A., Kaster, L.C., Girardi, C.L., Danieli, R., 2001. Harvesting stage and cold storage influences on the quality of Chiripá peaches (*Prunus persica* L.). *Ciência Rural* 31, 19–25.
- Rombaldi, C.V., Silva, J.A., Machado, A.L., Parussolo, A., Lucchetta, L., Zanuzzo, M.R., Girardi, C.L., Cantillano, R.F., 2002. Storage of Chiripá peach in controlled atmosphere. *Ciência Rural* 31, 43–47.
- Sister, E.C., Dupille, E., Serek, M., 1996. Effect of 1-methylcyclopropene and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. *Plant Growth Regul.* 18, 79–86.
- Zhou, H.W., Ben-Arie, R., Lurie, S., 2000a. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. *Phytochemistry* 55, 191–195.
- Zhou, H.W., Lurie, S., Lers, A., Khatchitski, A., Sonogo, L., Ben Arie, R., 2000b. Delayed storage and controlled atmosphere storage of nectarines: two strategies to prevent woolliness. *Postharvest Biol. Technol.* 18, 133–141.
- Zhou, H.W., Dong, L., Ben-Arie, R., Lurie, S., 2001. The role of ethylene in the prevention of chilling injury in nectarines. *J. Plant Physiol.* 158, 55–61.

Artigo II

EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE A QUALIDADE E LANOSIDADE DE PÊSSEGOS CONSERVADOS SOB REFRIGERAÇÃO

Zanuzo, M. R¹., Rombaldi, C. V¹., Silva, J. A¹., Ferrareze, J. P¹., Dal Cero J¹., Pegoraro, C¹., Nora, L¹., Girardi, C, L².

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pelotas, Rio Grande do Sul.

² Embrapa Uva e Vinho Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul

RESUMO

Em pêssegos chiripá, lanosidade é um dos maiores distúrbios fisiológicos que afeta a qualidade pós-colheita. Em trabalhos prévios, foram observado a ocorrência da lanosidade em aproximadamente 30-40% dos frutos após 25 – 35 dias de armazenamento refrigerado (AR) à 0°C e 90-95% de umidade relativa (UR). Suplementando durante o AR com aplicação de etileno ou aquecimento intermitente, ou usando atmosfera controlada (AC), a lanosidade pode ser prevenida, como um resultado do melhor processo de amadurecimento com um bom balanço da atividade de poligalacturonase (PG) e pectina metil esterase (PME). Em adição, alguns estudos mostraram que a aplicação de ácido giberélico (AG₃) na pré-colheita retarda a maturação, aumenta o tamanho do fruto e prolonga a vida de prateleira de pêssegos. Na tentativa de confirmar essa hipótese, AG₃ (100mg.L⁻¹) foi aplicado em pêssegos “Chiripá”: T1) AG₃ no início da fase do endurecimento do caroço; T2) AG₃ no final da fase de endurecimento do caroço; e T3) controle (sem AG₃). Durante o desenvolvimento foi mensurado o perímetro dos frutos e imediatamente depois da colheita os pêssegos “Chiripá” foram armazenados a 1±1°C e 90-95 % de UR por 30 dias. As análises foram conduzidas após a colheita e 6, 24, 48 e 72 horas depois do período de armazenamento. Os pêssegos tratados com AG₃ no início do endurecimento do caroço (T1) mostraram um aumento de tamanho (40%) e maior atividade PME do que os outros tratamentos, mas o processo de maturação não foi retardado. Depois do armazenamento refrigerado, os frutos correspondentes ao T1 mostraram baixa incidência de lanosidade, alcançando índices menores que 16% nos frutos. Ao

contrário, a maioria dos frutos do T₂ e T₃ (controle) exibiram este sintomas. Estes resultados mostraram que AG₃, quando aplicado no início do endurecimento do caroço, aumenta o tamanho do frutos, e torna-se uma boa alternativa na prevenção da incidência da lanosidade, induzindo a atividade PME e PG simultaneamente.

Palavras chave: Pêssego, lanosidade, PG, PME, AG₃(Ácido giberélico)

ABSTRACT

In 'Chiripá' peach, woolliness is a major physiological disorder that affects the postharvest quality. We have previously observed that woolliness occurs in approximately 30–40% of the fruit after 25–35 days of cold storage (CS) at 0°C and 90–95% relative humidity (RH). Supplying CS with ethylene application or intermittent warming, or using controlled atmosphere, the woolliness can be prevented, as a result of better ripening process with a good balance of polygalacturonase (PG) and pectin methyl esterase (PME) activity. In addition, some studies showed that gibberellic acid (AG₃) in preharvest delays ripening, increases fruits size and extends the shelf life of peaches. In order to confirm this hypothesis, AG₃ (100mg.L⁻¹) was tested in 'Chiripá' peach: T₁) AG₃ at the beginning of pit hardening (AG₃-1); T₂) AG₃ at the end of the pit hardening (AG₃-2); and T₃) control- no AG₃. During growing was measured the perimeter of fruits and immediately after harvest Chiripá peaches were CS at 1±1°C and 90-95 % of RH for 30 days. The evaluations were carried out just after harvest and 6, 24, 48 and 72 hours after CS. Peaches treated with AG₃ at beginning of pit hardening (AG₃-1) showed bigger size (40% bigger) and higher PME activity than the other treatments, but the ripening process was not delayed. After CS, the fruits corresponding to treatment T₁ showed very low incidence of woolliness, attends less than 16% of fruits. In contrast, mostly of fruits from T₂ and T₃ treatments exhibited this chilling injury. These results showed that AG₃, when supplied at beginning of pit hardening, increases peaches size

and becomes a good way to prevent woolliness incidence, inducing PME and PG activity, simultaneously.

Key-words: fruits, ripening, cell wall, peach, giberellic acid, cold storage, woolliness.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de lanosidade é um dos principais problemas que limitam o armazenamento em atmosfera refrigerada (AR), e para a conservação após o AR, de pêssegos 'Chiripá' (Girardi et al. 2005). Lurie & Crisosto (2005) citam que esse distúrbio ocorre em praticamente todas as cultivares de pêssegos de polpa fundente e em nectarinas, e que a prevenção desse problema é pré-requisito para a manutenção dessas cultivares no mercado. Essa afirmativa é corroborada por Nava & Brackmann (2002) e por Girardi et al. (2005) que verificaram que, em média, 80% dos pêssegos 'Chiripá' armazenados em AR por 30 dias e mantidos durante 2 a 5 dias em temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) após o AR, apresentam-se com sintoma de lanosidade.

Buscando esclarecer as causas desse distúrbio e propondo soluções para o problema, vários trabalhos têm sido realizados (Amarante et al. 2005; Nava & Brackmann, 2002; Girardi et al. 2005; Ju et al. 1999; Lurie & Crisosto, 2005; Martinez-Romero et al. 2000; Zilah et al. 1997). Uma das causas mais prováveis da ocorrência de lanosidade em pêssegos e nectarinas, é o descompasso entre a atividade de poligalacturonases (PGs) e pectilmetilesterases (PMEs). Mais detalhadamente, foi observado que, por exemplo, ao armazenarem-se pêssegos 'Chiripá' em AR, há uma maior inibição da atividade PG do que PME, favorecendo a formação de lanosidade. Porém, Brackmann & Nava (2002) afirmam que se o armazenamento for realizado em atmosfera controlada (AC), previne-se parcialmente esse problema. Isso efetivamente ocorre e Girardi et al. (2005) demonstraram que a AC exerce um melhor controle sobre a atividade PG e PME do que a AR. Complementarmente, Lurie & Crisosto (2005) citam que para evitar-se a lanosidade devem-se adotar procedimentos que inibam equitativamente os dois grupos de enzimas (PGs e PMEs) ou que as estimulem também de forma equitativa. Como métodos que empregam essas estratégias, citam o emprego de AC, aplicação de etileno durante o armazenamento em AR, aquecimento intermitente durante o AR, pré-aquecimento dos frutos previamente ao AR, aplicação de fitoreguladores que estimulem a expansão celular, com a indução de enzimas hidrolíticas da parede celular. Nesse último Zilah et al. (1997); Martinez-Romero et al.

(2000); Ju et al. (1999) citam o ácido giberélico (AG_3) com potencial indutor dessa resposta, embora não demonstrem sua eficácia. Ju et al. (1999) demonstraram que a aplicação de AG_3 contribui para o retardamento da maturação, aumento do tamanho dos frutos e melhoria da conservabilidade de pêssegos. Amarante et al. (2005) realizaram trabalho similar, buscando validar a tecnologia para pêssegos 'Rubidoux', e confirmaram o efeito positivo da aplicação do AG_3 no aumento da massa dos frutos, na prevenção de rachaduras e podridões, e prevenção do escurecimento da polpa após o AR. As razões pelas quais a aplicação pré-colheita de AG_3 previniu a ocorrência de danos pelo frio, comumente denominados "chilling injury", não foram demonstradas. Porém, de acordo com Thomas et al. (2005), as giberelinas podem contribuir, durante a formação dos frutos, para a indução de genes correspondentes a enzimas hidrolíticas da parede celular e do endoesqueleto, facilitando a expansão celular e solubilização de polissacarídeos.

Baseando-se nessas informações emitiu-se a hipótese de que a aplicação de AG_3 em pêssegos 'Chiripá' na pré-colheita pode, além de retardar a maturação e aumentar o tamanho das frutas, serem capaz de melhorar o potencial de conservação.

Em experimento realizado na safra 2005-2006, testou-se essa hipótese e verificou-se que ela é parcialmente verdadeira, ou seja, a aplicação de giberelinas contribui para o aumento do tamanho dos frutos, mas não prolongou o ciclo de maturação. Além disso, observou-se que quando os pêssegos foram armazenados em AR, a única variável influenciada pelos tratamentos foi a ocorrência da lanosidade não havendo efeito sobre firmeza de polpa, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, ácido ascórbico e potencial antioxidante. A partir desse experimento piloto, emitiu-se a hipótese de que a aplicação de AG_3 na fase inicial do endurecimento do caroço aumenta o tamanho dos frutos e previne a ocorrência de lanosidade, pelo melhor equilíbrio entre as atividades de enzimas PG e PME.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em um pomar comercial no município de Farroupilha-RS, em 2006-2007, com pessegueiros 'Chiripá', de cinco anos de idade,

provenientes de mudas com porta-enxerto 'Capdebosq', e cultivados com espaçamento de 5m x 3,5m, adotando-se o sistema de condução em Y. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de 10 plantas cada, consistindo das seguintes aplicações: T1 – aplicação de AG₃ na concentração de 100 mg L⁻¹, quando os frutos iniciaram a fase de endurecimento do caroço (Fase estacionária da curva de crescimento); T2 - aplicação de AG₃ na concentração de 100 mg L⁻¹, quando os frutos estavam na fase final do endurecimento do caroço (Fase exponencial da curva de crescimento); T3 – controle, sem aplicação de AG₃. Para a instalação do experimento selecionou-se uma área homogênea de pomar de 0,5ha, na qual foram sorteadas as parcelas contendo 10 plantas cada. O AG₃ foi pulverizado com a adição de Silwet[®] L-77 na concentração final de 0,05% (v/v). A escolha da concentração de AG₃ de 100 mg L⁻¹, bem como os estádios da aplicação (T1) e (T2), foram baseada em trabalhos prévios de Ju et al. (1999), Martinez-Romero et al. (2000), Amarante et al. (2005) e Crisosto (2006, informação pessoal).

Também na fase estacionária de crescimento dos frutos realizou-se raleio em todos os tratamentos, tomando-se por referência a relação número de frutas por cm² de área da secção transversal do tronco, medida a 20cm acima da superfície do solo, conforme recomendação de Pereira et al. (1987), permanecendo 6 frutos por cm² da área da secção do tronco. As demais práticas de manejo do pomar, tais como cobertura do solo com aveia preta, adubações de manutenção, poda de inverno e de verão, tratamentos fitossanitários para controle de pragas e doenças, também foram realizadas de forma homogênea em toda a área.

A variável avaliada no pomar foi perímetro da região equatorial do fruto, visando a construção da curva de crescimento. Para a medição do perímetro realizaram-se avaliações semanais, em todos os frutos de duas pernas por planta distribuídas alternadamente nos diferentes quadrantes em todos os tratamentos. O monitoramento dessa variável iniciou 10 dias após o término da floração até a colheita dos frutos no estágio de maturação comumente adotado para a colheita dessa cultivar destinada ao armazenamento refrigerado, conforme previamente citado por Girardi et al. (2005). Em

média mensuraram-se 850 frutos por tratamento por semana. Os resultados foram expressos em mm.

Na colheita, as variáveis de monitoramento da maturação analisadas foram coloração de fundo, coloração avermelhada, firmeza de polpa e sólidos solúveis totais. Para essas avaliações, utilizou-se aproximadamente 20% dos frutos colhidos em cada repetição, o que totalizou, em média, 170 pêssegos. Os frutos restantes foram destinados ao armazenamento em AR. Para a avaliação da cor de fundo determinou-se o ângulo H, com o auxílio de colorímetro Minolta® CR-300; da coloração avermelhada, atribuindo-se escala 1 para frutos com menos do que 25% da superfície com recobrimento avermelhado, escala 2 para frutos com 25% a 50% da superfície com recobrimento avermelhado, 3 para frutos com 50% a 75% da superfície com recobrimento avermelhado; e escala 4 para frutos com mais do que 75% da superfície avermelhada; da firmeza de polpa, com penetrômetro Effegi, munido de ponteira de 7,9mm de diâmetro, sendo os resultados expressos em N; dos sólidos solúveis totais, com refratômetro Abbe Atago®, sendo os resultados expressos em % (massa/massa).

Como variáveis de avaliação enzimática, determinou-se a atividade PG e PME, conforme método já empregado e citado por Zhou et al. (2000).

Complementarmente, os pêssegos dos três tratamentos foram armazenados em ar refrigerado (AR) na temperatura de $1\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $90\pm 7\%$, durante 30 dias. Passado esse período, os frutos foram removidos da câmara e mantidos a $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ por 4 dias. As avaliações foram realizadas 6h após a retirada da câmara, 24hs, 48hs e 72hs. Como variáveis de monitoramento determinou-se o percentual de frutos com lanosidade e as atividades enzimáticas da PG e PME, sempre adotando-se os métodos já descritos por Zhou et al. (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de crescimento dos pêssegos 'Chiripá' (Figura 1), tratados ou não com AG3, foi sigmóide. Isso já era esperado, tendo em vista que esse é o comportamento

clássico da curva de crescimento de pêssegos e nectarinas (Gomes et al. 2005; Lurie & Crisosto, 2005).

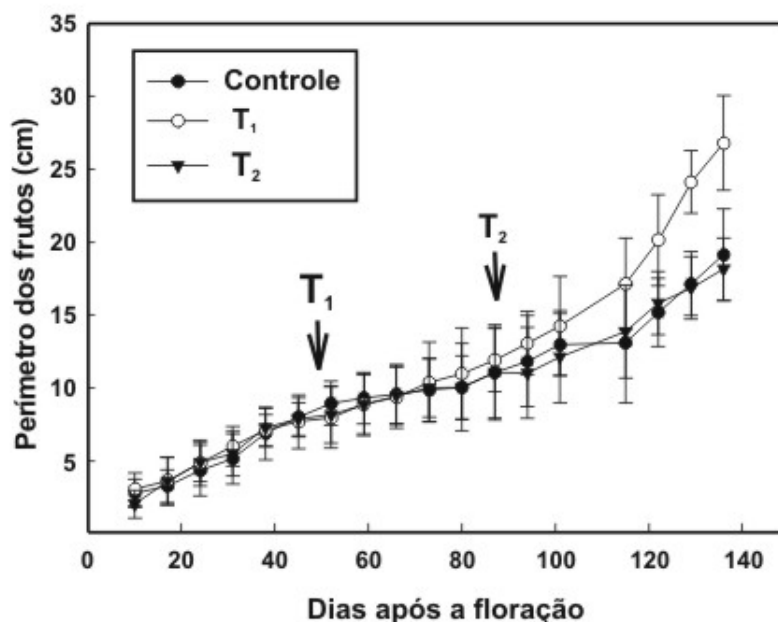


Figura 0—1 - Curva de crescimento de frutos controle e tratados de pêssegos cv. 'Chiripá' com AG₃ no início da fase de endurecimento do caroço (T₁) (Fase estacionária) e na fase de crescimento após o endurecimento do caroço (T₂) (Fase exponencial). As barras verticais representam o desvio padrão da média. (n= 100)

Como resposta à aplicação do AG₃, observou-se que os frutos tratados com esse fitoregulador no início da fase de endurecimento do caroço apresentaram maior taxa de crescimento, atingindo, em média, um perímetro 40% superior ao de pêssegos não tratados. No entanto, a aplicação de AG₃ quando os frutos já haviam iniciados a nova fase de crescimento acelerado após o endurecimento do caroço, não contribuiu para o aumento do perímetro dos frutos (Figura 1).

Diferindo de trabalhos anteriores (Ju et al. 1999; Amarante et al. 2005) não houve efeito do AG₃ no retardamento da maturação (Tabela 1).

Tabela 0—1 - Principais características físico-químicas no momento da colheita de pêssegos cv. 'Chiripá' tratados com AG₃ no início da fase de endurecimento do caroço (T1) (fase estacionária) e na fase de crescimento após o endurecimento do caroço (T2) (fase exponencial) em relação ao controle (sem AG₃).

Tratamentos	Perímetro (mm)	Massa (g)	Ângulo H	Coloração vermelha (1-4)	Firmeza de polpa (N)	SST (%)
Controle	19,14±3,15	102,12±20,25	98,12±3,14	1	50,25±5,17	12,01±0,42
T1	26,8±3,26	150,14±25,48	102,01±5,05	1	48,14±5,36	11,82±0,32
T2	18, 15±2,15	100,04±20,68	100,07±5,06	1	52,25±7,67	12,23±0,52

Os pêssegos, tratados e não tratados com AG₃, puderam ser colhidos na mesma data e, pelas variáveis comumente empregadas para o acompanhamento da maturação, situaram-se em estádios similares de maturação, com ângulo H entre 95 e 107 na coloração de fundo, até 25% da superfície com coloração avermelhada (nota 1 na escala de coloração de recobrimento avermelhada), firmeza de polpa entre 43 e 59N e sólidos solúveis totais entre 11,5 e 12,8 %.

Ao analisarem-se as duas enzimas mais citadas como provavelmente envolvidas no metabolismo de hidrólise de pectinas, verificou-se que a aplicação de AG₃ no início da fase estacionária de crescimento (T1), resultou numa maior atividade PME por ocasião da colheita, mas não houve efeito sobre a atividade PG (Figura 2).

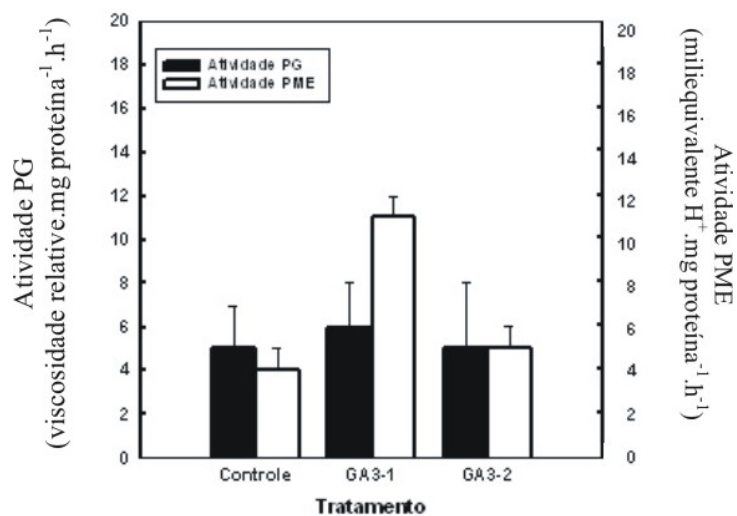


Figura 0—1 - Atividade poligalacturonase (PG) (viscosidade relativa.mg proteína⁻¹.h⁻¹) e pectilmetilesterase (PME)(MiliequivalentesH⁺.mg proteína⁻¹.h⁻¹) em pêsegos cv. 'Chiripá' tratados e não tratados com AG₃ à campo no início da fase de endurecimento do caroço (AG₃-T1) e na fase de crescimento após o endurecimento do caroço (AG₃-T2) durante a colheita.

De modo geral é amplamente relatado (Dawson et al. 1992; Lurie et al. 1994; Zhou et al. 1999; Nava & Brackmann, 2002; Girardi et al. 2005; Lurie & Crisosto, 2005) que o descompasso entre as atividades PME e PG durante o AR constitui-se na causa mais provável da lanosidade. Mas, neste estudo realizado, foi mensurado a atividade antes e depois do AR, tendo-se demonstrado que a elevada atividade PME (Figura 2), ao contrário de ser indutora do problema, preveniu a ocorrência de lanosidade (Tabela 2).

Tabela 0—1 - Ocorrência de lanosidade (%) em pêssegos ‘Chiripá’, armazenados por 30 dias em AR a 0°C e mantidos em temperatura de 23±3°C por 6, 24, 48 e 72 horas. Esses frutos foram tratados no campo com AG₃ no início da fase de endurecimento do caroço (T1) e na fase de crescimento após o endurecimento do caroço (T2), sendo comparados com o controle (sem AG₃).

Tratamentos	Período pós-colheita (horas)			
	6	24	48	72
Controle	0	0	52±5	100
T1	0	0	0	15±8
T2	0	0	50±10	65±10

Crisosto (2006 – comunicação pessoal) citou que, provavelmente, a aplicação de AG₃ pode estimular a síntese e atividade de PME's e outras enzimas hidrolíticas da parede celular e do endoesqueleto, favorecendo a divisão celular e evitando a formação da lanosidade. Assim a elevada atividade PME na pré-colheita seria positiva em termos de proteção à lanosidade e quando essa alta atividade ocorre durante o AR, favoreceria a formação da textura lanosa ou farinhenta. Ao contrário do que se esperava, a aplicação de AG₃ na fase estacionária de crescimento mostrou induzir ambas as enzimas (PG e PME) (Figura 3) e, em contrapartida, o percentual de lanosidade foi reduzido quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 2).

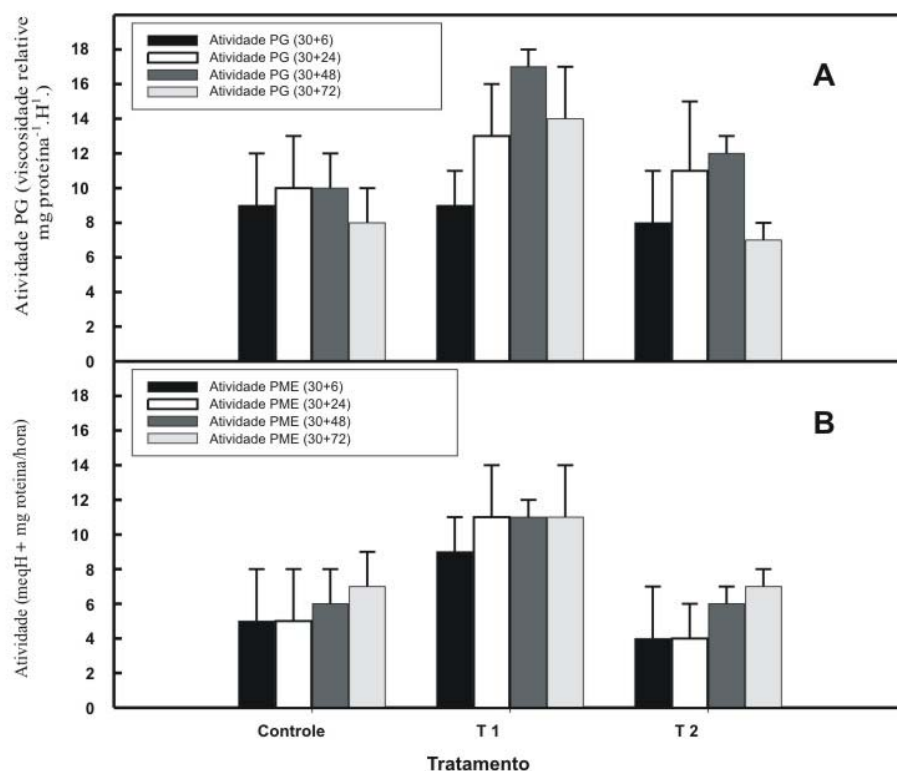


Figura 0—1 - Atividade poligalacturonase (PG) (A) e pectilmetilesterase (PME) (B) em pêssegos cv. 'Chiripá' tratados e não tratados com AG₃ à campo armazenados por 30 dias em AR a 0°C e mantidos por 6, 24, 48 e 72 horas em temperatura de 23±3 °C no início da fase de endurecimento do caroço; fase estacionária (T1) e na fase de crescimento após o endurecimento do caroço; fase exponencial (T2) e controle (sem AG₃).

A comprovação dessa hipótese ainda não ocorreu, mas os resultados obtidos corroboram com a afirmativa, ou seja, os pêssegos tratados com AG₃ no início da fase estacionária apresentaram maior crescimento (Figura 1), maior atividade PME por ocasião da colheita (Figura 2), e baixos percentuais de frutas com sintoma de lanosidade após o AR (Tabela 2), além de se ter observado um menor crescimento das frutas (Figura 1) e maior atividade PME após o AR (Figura 3).

Já os frutos tratados mais tardiamente (T2), e não tratados (controle), mostraram elevada ocorrência de lanosidade, atingindo a praticamente totalidade das frutas após o AR (Tabela 2), além de se ter observado um menor crescimento das frutas (Figura 1) e menor atividade PME por ocasião da colheita e após o AR (Figura 2 e 3).

Baseando-se em trabalhos prévios (Amarante et al. 2005; Ju et al, 1999; Zilah et al. 1997) emitiu-se a hipótese de que o tratamento com AG₃ pudesse retardar a maturação dos pêssegos 'Chiripá'. Isso não ocorreu (Tabela 1), mesmo tendo-se utilizados dosagens de AG₃ similares às empregadas por esses autores. A razão exata desse comportamento não foi demonstrada, mas Tomas et al. (2005) citam que as respostas a ação de giberelinas são altamente variáveis entre genótipos e inclusive condições edafoclimáticas, o que poderia explicar, ao menos em parte, o resultado obtido nesse estudo. Amarante et al. (2005), Lurie & Crisosto (2005), Martinez-Romero et al. (2000) e Zilah et al. (1997) citam também que o uso de AG₃ na pré-colheita pode melhorar o potencial de armazenamento de pêssegos. Neste trabalho constatou-se que a grande contribuição ocorreu na prevenção da ocorrência de lanosidade (Tabela 2), não tendo sido verificadas contribuições adicionais, como por exemplo, na firmeza de polpa, sólidos solúveis totais, acidez (dados não apresentados) na tabela 1.

CONCLUSÃO

A aplicação de AG₃ em pêssegos 'Chiripá', se realizado no período T1, fase de início do endurecimento do caroço durante a fase estacionária da curva de crescimento, aumenta o tamanho dos frutos; não retarda a maturação e previne a ocorrência da lanosidade, após o AR.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo auxílio à pesquisa, à bolsa de IC e de PQ, e à CAPES pelo auxílio à bolsa de doutorado. Ao produtor rural Flávio Fabro, de Farroupilha-RS, pela disponibilização do pomar e de equipamentos para condução do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, C.V.T.; DREHMER, A.M.F.; SOUZA, F.; FRANCESCATO, P. A pulverização pré-colheita com ácido giberélico(AG3) e aminoetoxivinilglicina (AVG) retarda a maturação e reduz a perda de frutos na cultura do pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.1, Jaboticabal, p. 1-5, 2005.

- DAWSON, D., MELTON, L., WATKINS, C. Cell wall changes in nectarine (*Prunus persica*). **Plant Physiol.** 100, 1203–1210, 1992.
- NAVA, G. A. & BRACKMANN, A. Armazenamento de pêsegos (*Prunus persica* (L.) Batsch), cv. Chiripá, em atmosfera controlada. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p.328-332, 2002.
- GIRARDI, C.L.; CORRENT, A.; LUCCHETTA, L.; ZANUZO, M.R.; BRACKMANN, A.; TWYMAN, R.M.; NORA, L.; NORA, F. SILVA, J.A.; ROMBALDI,C.V. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripá) during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, Netherland, v. 38, n. 1, p.25-33, 2005.
- GOMES, F. R. C., FACHINELLO, J. C., MEDEIROS, A. R. M.; GIACOBO, C.L.; SANTOS, I.P. Influência do manejo do solo e da intensidade de raleio de frutas, no crescimento e qualidade de pêsegos, cvs. Cerrito e Chimarrita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.1, Jaboticabal, p. 60-63, 2005.
- JU, Z.; DUAN, Y.; JU, Z. Combinations of AG3 and AVG delay fruit maturation, increase fruit size and improve storage life of 'Feicheng' peaches. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Kent, v. 74, n. 5, p. 579-583, 1999.
- LURIE, S., LEVIN, A., GREVE, C.L., LABAVITCH, J.M. Pectic polymers from normally and abnormally ripening nectarines. **Phytochemistry** 36, 11–17, 1994.
- LURIE, S. & CRISOSTO, G.M. Chilling injury in peach and nectarine. **Postharvest Biology and Technology**, Netherland, n. 38, v. 3, p.239-246, 2005.
- MARTÍNEZ-ROMERO, D.; VALERO, D.; SERRANO, M.; BURLÓ, F.; CARBONELL, A.; BURGOS, L.; RIQUELME, F. Exogenous polyamines and gibberellic acid effects on peach (*Prunus persica* L.) storability improvement. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.2, p. 288-294, 2000.
- PEREIRA, J. F. M.; FELICIANO, A. J.; RASEIRA, M. do C. B.; SILVA, J. B. da. Curvas de crescimento, época de raleio e previsão do tamanho final do fruto em três cultivares de pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, n.9/10, p.965-974, 1987.
- SANTOS FILHO, B. G. dos.; MORAES, D. M. de M.; MORAES, R. de C. P. Caracterização do crescimento dos frutos de duas cultivares de pêsego para a indústria. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 1, , p. 91-97, 1991.
- THOMAS, S.; RIEU, T.; STEBER, C. Gibberellin metabolism and signaling. In: *Vitamins and Hormones*, v. 72, Elsevier, London, p. 289-338, 2005.

ZHOU, H.W., SONEGO, L., BEN-ARIE, R., LURIE, S. Analyses of cell wall components in juice of 'Flavortop' nectarine during normal ripening and wooliness development. **J. Am. Hortic. Sci.** 124 (4), 424–429, 1999.

ZILAH, S.; LURIE, S.; LAPSKER, Z.; DAVID, I.; YESSELSOON, Y.; BEN ARIE, R. The ripening and storage quality of nectarine fruits in response to preharvest application of gibberellic acid. **Journal Horticultural Science**, EUA, n.72, p.355-362, 1997.

Artigo III

CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE POLIGALACTURONASE, PECTINESTERASE E EXPANSINA EM PÊSSEGOS “CHIRIPÁ” EM CONDIÇÕES QUE PREVINEM E FAVORECEM A OCORRÊNCIA DE LANOSIDADE

Zanuzo, Marcio Roggia; Lucchetta, Luciano; Pegoraro, Camila; Dal Cero, Joceani; Silva, Jorge Adolfo; Brackmann, Auri; Delagostin, Odir; Borsuck, Sibebe; Rombaldi, César Valmor

RESUMO

A lanosidade é um dos principais distúrbios fisiológicos em pêssegos “Chiripá” submetidos ao armazenamento refrigerado (AR). Neste estudo produziram-se anticorpos policlonais dirigidos contra poligalacturonase (PG), Pectinesterase (PE) e Expansina (Exp), e avaliou-se, pela técnica de *western blot*, a expressão dessas proteínas em pêssegos sob condições que favorecem (AR por 30 dias a $1\pm 1^{\circ}\text{C}$), ou previnem (atmosfera controlada (AC) 2kPa de O_2 e 5kPa de CO_2 , e AR de frutos tratados com ácido giberélico (AG_3) na pré-colheita. As avaliações foram realizadas na colheita dos frutos e após a retirada da câmara (0, 2, 4, 6 e 8 dias a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$). Os anticorpos anti-PG, anti-PE e anti-Exp reagiram com as respectivas proteínas recombinantes, mas somente os dois primeiros foram eficientes na imunodeteção das respectivas proteínas em pêssegos “Chiripá” durante a maturação, e após o armazenamento em AR e em AC. Imediatamente após a retirada dos pêssegos do AR, não houve expressão da proteína PG, mas sim da PE, o que pode ter favorecido a ocorrência de lanosidade. Os pêssegos armazenados nas condições de AC ou submetidos à aplicação de AG_3 , com armazenamento em AR, tiveram a ocorrência da lanosidade parcialmente prevenida, provavelmente por terem mantido um melhor equilíbrio entre a expressão das enzimas PG e PE.

ABSTRACT

Wooliness is the most important physiological disturbs in “Chiripá peaches” submitted to refrigerated atmosphere (RA) In this study was produced policlonal antibody, driven against polygalacturonase (PG), pectinesterase (PE) and expansin (Exp), and tested by *western blot* techniques, the expression these proteins in peaches under favorable conditions (RA for 30 days to $1\pm 1^\circ\text{C}$), or prevent (controlled atmosphere (AC) 2kPa of O_2 and 5kPa of CO_2), and treated fruits in RA with giberellic acid (GA_3) on pre-harvest.. Evaluations were carried out in the harvest and after leave out of cooling room (0, 2, 4, 6 and 8 days at $23\pm 2^\circ\text{C}$). The anti-PG, anti-PE and anti-Exp antibodies, reacted with respectives recombinant proteins, but anti-PG and anti-PE were efficient in the imunodetection of the respective proteins in “Chiripá” peaches during ripening and after RA and CA storage. Immediately after retreat peaches of RA conditions, there was not protein expression of PG, but PE yes, what can have take advantage the wooliness occurrence. The peaches stored in CA conditions or submitted to GA_3 supplied with RA storage, had prevent parcial wooliness occurrence, probably by kept a better balance between PG and PE enzymes expression.

Key-words: fruits, ripening, cell wall, peach, giberellic acid, cold storage, wooliness, *western blot*.

1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de pêssegos é de aproximadamente 150 mil toneladas anuais, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor nacional, com 95 mil toneladas. Nesse Estado, três pólos são destaques na produção: Região Sul (predominando a produção de frutas com dupla finalidade – *in natura* e industrialização), Região Metropolitana e da Serra do Sudeste (com predominância de frutas para consumo *in natura*). O consumo *per capita* de pêssegos no Brasil ainda é baixo, em torno de 0,8 kg.hab⁻¹.ano⁻¹ (Tibola et al. 2005). Esse baixo consumo *per capita* pode ser explicado pela falta de inovação e diferenciação do sistema de produção e dos produtos industrializados. Além disso, há dificuldade de solidificação do hábito de consumo *in natura*, fato esse gerado pela oferta de pêssegos a elevados preços, sem padrões de identidade, com distúrbios fisiológicos como escurecimento interno, lanosidade, e susceptibilidade a podridões (Lagos et al. 2000). Estima-se, a partir de estudos junto à cadeia produtiva de pêssegos do RS, que as perdas quantitativas (frutos com danos mecânicos e podridões) atinjam 25% da produção. Destaca-se, no entanto, que não foram quantificadas as perdas qualitativas (danos latentes, distúrbios fisiológicos não expressos externamente, além de perdas nutricionais e funcionais).

Para as principais cultivares destinadas à produção de pêssegos para consumo *in natura*, três problemas principais têm sido destacados após a colheita: podridões, escurecimento interno e lanosidade (Rombaldi et al. 2001, 2002; Brackmann & Nava 2002). As podridões atingem praticamente todas as cultivares; o escurecimento interno é mais freqüente em pêssegos de polpa amarela; e a lanosidade ocorre intensamente em pêssegos de polpa branca (Wills et al. 1998; Lurie & Crisosto, 2005). Esse último distúrbio é fator limitante para o prolongamento da vida de prateleira de pêssegos de cultivares como “Chimarrita” e “Chiripá”, importantes cultivares produtoras de pêssegos de polpa branca (Nava & Brackmann, 2002; Rombaldi et al. 2002; Girardi et al. 2005). Esse problema é tão significativo que vários produtores decidiram reduzir a área cultivada com essas cultivares e/ou substituí-las por genótipos que não apresentam suscetibilidade à lanosidade. Vários trabalhos (Wills et al. 1998; Rombaldi et al. 2002; Nava & Brackmann, 2002; Girardi et al. 2005) demonstraram que esse problema pode

atingir a totalidade dos frutos após 20 a 30 dias de armazenamento refrigerado (AR) e 1 a 3 dias após a retirada dos frutos da câmara fria (Nava & Brackmann, 2002; Girardi et al. 2005; Ghiesbregt et al. 2006). Como métodos propostos para evitar-se a lanosidade têm sido propostos o uso de aquecimento intermitente (Lill et al. 1989; Artés et al. 1996; Fernandez-Trujillo et al. 1998), de atmosfera controlada (Zhou et al. 2000; Nava & Brackmann, 2002; Girardi et al. 2005), pré-acondicionamento térmico (Crisosto, comunicação pessoal), aplicação de etileno (Girardi et al. 2005). Apesar da validação dos resultados na pesquisa, a aplicação desses métodos em escala comercial ainda não foi realizada no mercado nacional.

Recentemente, trabalhos preliminares visando o retardo da maturação como a aplicação de fitohormônios como ácido giberélico (AG_3), demonstraram que esse tratamento no estágio inicial de endurecimento do caroço, favorece o aumento do tamanho dos frutos e previne a ocorrência de lanosidade. A causa desse comportamento não foi demonstrada. À semelhança disso, as causas exatas da ocorrência da lanosidade também não foram descritas, mas acredita-se que se deva a um descompasso entre a atividade de enzimas poligalacturonases (PGs) e de pectil metil esterases (PMEs) (Ben Arie & Sonego, 1980; Zhou et al. 2000; Girardi et al. 2005). Mais especificamente, foi observado que o AR tem uma ação mais efetiva no controle de PGs do que PMEs, o que resulta numa retomada incompleta do amadurecimento após o AR (Girardi et al. 2005). A alteração das pectinas provocada pelas PMEs durante o AR, favorece a geleificação das pectinas, alterando a textura e suculência dos pêssegos (Ben Arie & Sonego, 1980; Zhou et al. 2000). Essas afirmativas foram publicadas, mas são divergentes.

As ações buscando esclarecer a(s) causa(s) e/ou ações na prevenção do problema, têm sido direcionadas para o estudo de métodos de armazenamento (Lurie, 1992; Zhou et al. 2000b; Nava & Brackmann, 2002; Girardi et al. 2005), da atividade enzimática (Zhou et al. 2000; Zhou et al. 2001; Girardi et al. 2005;), e da expressão de genes no nível transcricional (Liguori et al. 2004; Callahan et al. 2004; Hayamma et al. 2006). Pelo fato de disporem-se de seqüências de cDNAs correspondentes aos genes da PG, PE e Exp, torna-se possível a produção de anticorpos dirigidos contra as correspondentes proteínas. Com a disponibilidade de anticorpos policlonais será

possível associar-se a resposta fisiológica (ocorrência de lanosidade), com a atividade enzimática e presença da(s) proteína(s). Esse evento se completaria com o estudo de mRNAs codificadores por essas enzimas, mas, em ensaios preliminares, detectaram-se problemas com a reprodutibilidade dos resultados com os métodos já publicados (Wan & Wilkins, 1994; Ikoma et al. 1996). Mesmo empregando exatamente os mesmos procedimentos e reagentes, não obteve-se reprodutibilidade de resultados, nem entre repetições dos tratamentos, nem em repetições das análises. Essa problemática também já foi citada para outros materiais vegetais, especialmente ricos em carboidratos e compostos fenólicos (Hu et al. 2002), como é o caso do pêssego. Porém, a solução ainda não foi descrita. Recentemente, foi disponibilizado o método Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen®), que inclui tampão com o mesmo nome, de composição não disponibilizada, proposto como eficiente nesses casos de dificuldade de extração de mRNAs. Em ensaios preliminares, verificou-se que a dificuldade persiste. Por essa razão adicional, optou-se por produzir-se anticorpos policlonais, a partir de proteínas recombinantes, de modo a monitorar-se a tradução e ocorrência de lanosidade em pêssegos “Chiripá” submetidos às condições que favoreçam e que previnam esse problema.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

Para atender aos objetivos propostos, primeiramente foram preparados anticorpos policlonais anti-PG, anti-PME e anti-Exp, a partir das respectivas proteínas recombinantes. Para isso foi necessário obter os cDNAs, realizar a clonagem, a produção das proteínas recombinantes e dos anticorpos policlonais. Confirmada a capacidade desses anticorpos em detectar as respectivas proteínas recombinantes, passou-se a utilizá-los para a imunodeteção da PG, PME e Exp em extratos protéicos de pêssegos “Chiripá” submetidos a condições de armazenamento que favoreçam e que previnam a lanosidade.

2.1- Material vegetal

Foram utilizados pêssegos “Chiripá” proveniente de pomar comercial do município de Farroupilha-RS, na safra 2006-2007. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições de 10 plantas cada: T1 – controle (sem aplicação de ácido giberélico (AG₃) e armazenamento em atmosfera refrigerada (AR); T2 – aplicação de AG₃ na concentração de 100 mg.L⁻¹ quando os frutos iniciaram a fase estacionária da curva de crescimento e armazenados em AR; e, T3- Pêssegos sem aplicação de AG₃ e armazenados em atmosfera controlada (AC) com 2Kpa de O₂ e 5Kpa de CO₂. Em ambos os tratamentos, os pêssegos foram colhidos e armazenados por um período de 30 dias à temperatura de 1±1°C e umidade relativa de 90-95%, sendo realizados avaliações por ocasião da colheita e após a retirada da câmara, mantendo os frutos a 23±2°C e 75-80% de UR, por 2, 4, 6 e 8 dias respectivamente. O AG₃ foi pulverizado com a adição de Silwet[®] L-77 na concentração final de 0,05% (v/v) e vazão de 350 a 400L.ha⁻¹. A concentração de AG₃ de 100 mg.L⁻¹, bem como o estágio da aplicação, são baseados em trabalhos precedentes de Ju et al. (1999), Martinez-Romero et al. (2000), Amarante et al. (2005) e Crisosto (2006, informação pessoal).

2.2- Variáveis analisadas

As variáveis estudadas foram a expressão de proteínas correspondentes às enzimas poligalacturonase (PG), pectinesterase (PE) e Expansinas(Exp) pela técnica de *Western blot* e a ocorrência de lanosidade conforme método descrito por Girardi et al. (2005).

2.2.1 - Obtenção de anticorpos policlonais anti-PG, anti-PME e anti-Exp

A obtenção dos anticorpos fez-se mediante o isolamento de RNAs, a construção dos cDNAs correspondentes à PG, PE e Exp, clonagem, produção das proteínas recombinantes, purificação e a obtenção dos anticorpos propriamente dita em

camundongos.

2.2.1.1 – Isolamento de RNA

Os RNAs foram extraídos a partir de 50 mg de polpa de pêssegos com o uso do tampão TRIzol Reagent®(Invitrogen®), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg dos RNAs totais (tratados com DNase) usando poli T como 'primer' e o Kit SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen). A reação foi finalizada a 70 °C por 10 min, e as amostras tratadas com RNase H (Invitrogen®).

Para cada extração de RNA total, pesaram-se aproximadamente 50mg de polpa em microtubos, marca eppendorf® de 1,5 mL. Ao material adicionaram 700 µl de TRIzol Reagent® (Invitrogen®) resfriado a 4°C, realizando-se a maceração do material. Na seqüência, a amostra foi mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Passado esse período, adicionaram-se 140µL de clorofórmio, e o conteúdo do tubo Eppendorf® foi homogeneizado manualmente até a formação de coloração rósea. A amostra foi mantida à temperatura ambiente por 3 minutos e, após, centrifugada a 10.000xg por 15 minutos a 4°C. Coletou-se a fase superior, aquosa, descartando-se o restante. À fase aquosa adicionaram-se 350µL de isopropanol. A amostra foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e adicionado 1 mL de etanol 75%, visando a lavagem do precipitado. Para isso realizou-se uma centrifugação a 7.500xg por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi mantido por 5 minutos a 35°C para secagem. Finalmente, o precipitado foi dissolvido em 50 µL de água ultrapura, previamente tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) 0,01% (v/v) e autoclavada por 40 min a 121°C, e incubado por 10 minutos a 55-60°C. Para a quantificação de ácidos nucleicos, a amostra foi diluída na proporção de 1:300 em água ultrapura tratada com DEPC. A determinação da concentração foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec® 2000 (Pharmacia®) com densidade óptica de 260nm e 280nm. Somente utilizaram-se amostras com relação 260/280nm entre 1,8 e 2,0.

2.2.1.2- Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNAs foi utilizado o kit comercial SuperScript™ First-Strand Syntesis System for RT-PCR (Invitrogen®). Essa técnica consiste na síntese de cDNA (uso da enzima transcriptase reversa) com oligonucleotídeos selecionados a partir de seqüências já conhecidas dos clones de interesse (fonte *Gene bank*), seguida de PCR (uso da enzima Taq DNA polimerase).

Em tubos tipo Eppendorf®, capacidade unitária de 0,5 mL, previamente autoclavados por 45 minutos a 121°C, adicionaram-se 10 µL da solução resultante da digestão com DNase I, 1µL de solução de dNTPs mix 10 mM (Invitrogen®) e 1µL de Oligo(dT) 12-16 (0,5 µg. µL⁻¹). Cada amostra foi incubada a 65°C por 5 minutos, e, após, mantida em gelo (1 a 4°C) por pelo menos, um minuto. Em seguida, adicionaram-se 9 µL de uma solução constituída de 2 µL tampão 10 X RT (Invitrogen®); 4 µL de solução a 25mM de MgCL₂; 2µL de solução 0,1 M de DTT e 1 µL de RNaseOUT Recombinant RNase Inibitor (Invitrogen®). Cada amostra foi, então, incubada a 42°C por 2 minutos. Ao fim desse período, adicionou-se 1 µL (50 unidades) SuperScript III RT (Invitrogen®). Para a reação de síntese, cada amostra foi mantida a 42°C por 50 minutos. Finalizou-se a reação, incubando a amostra a 70°C por 15 minutos, após os quais, as amostras foram mantidas em gelo (1 a 4°C). Após essa etapa, realizou-se a digestão com RNase H(Invitrogen®), na qual adicionou-se 1µL de dessa enzima, e as amostras incubadas por 20 minutos a 37°C.

Para amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e clonagem dos genes da PG, PE e Exp no vetor pCR2.1-TOPO-TA Cloning Kit® e vetor de expressão pAE utilizaram-se oligonucleotídeos selecionados a partir de seqüências fruto-específicas de pêssegos já depositadas no banco genético (PubMed). Para a seleção dos oligonucleotídeos, utilizou-se o software Vector NTI 9 (Informax inc.). O gene da poligalacturonase PG (Lester et al. 1994), Pectinesterase (PE) (Glover et al. 1994) e Expansina (Exp3) (Hayama et al. 2000) são identificados com seus respectivos números de acesso (X77231; X95991; AB047519). Os oligonucleotídeos foram desenhados contendo na extremidade 5' do oligonucleotídeo Forward o sítio de restrição para enzima *Bam*HI com fase no GGA, e para o oligonucleotídeo Reverse, o

sítio *KpnI*, além do códon stop TCA ou TTA. As seqüências dos oligonucleotídeos são mostrados a seguir na tabela 1.

Tabela 0—1 - Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação em PCR dos genes da Poligalacturonase, Pectinesterase e Expansina com os respectivos sítios de restrição para *Bam*HI e *kpnI*.

Poligalacturonase (EC 3.2.1.15)	Forward	CGGGATCCAACAACATCGTGGTG
	Reverse	GGGGTACCTCATCCCTCTGCATGGCT
Pectinesterase (EC 3.1.1.11)	Forward	CGGGATCCCTTGATTTGCTTGAC
	Reverse	GGGGTACCTTAAACCCCAAATTCTG
Expansina 3	Forward	CGGGATCCGGAGGCTCTGATGC
	Reverse	GGGGTACCTCATTTCACGCTCACCC

A reação de amplificação foi realizada em volume final de 50ul contendo 2ug de cDNA, 5mM MgCL₂, 0,2mM dNTP, 0,25µM de cada oligonucleotídeo e 1U de Taq DNA polimerase *platinum* recombinante (Invitrogen®). A reação de PCR foi realizada em um termociclador programado para uma desnaturação inicial (3 min a 95°C) seguido de 35 ciclos de 1min a 95°C (desnaturação), 1 min a 55 °C (anelamento) e 72°C por 1:30 (extensão final). Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados utilizando-se o Kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience®) e analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. O produto purificado foi clonado no vetor TOPO TA cloning kit® (Invitrogen®).

A reação de ligação constituiu de 10 µl de DNA (10ng), 1 µl de plasmídeo Topo-TA e 1,5 µl de Salt (1:4), e a reação mantida à temperatura de 23±3°C por 30 minutos seguindo as recomendações do fabricante. Para a verificação da clonagem dos insertos no vetor TOPO TA, 2µl do produto da ligação (inserto + plasmídeo), foram adicionados a 50µl de *E. coli* Top 10 competentes e submetidas à eletroporação na voltagem de 250KV em um eletroporador Bio-Rad®. Em seguida, adicionaram-se 500 µl de meio LB, mantendo-se a suspensão à temperatura de 37°C por 1 hora. Passado esse período, o produto foi cultivado em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de canamicina e 40 µg.mL⁻¹ de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo). A adição de X-GAL ao meio faz-se em presença do Operon *lacZ*

que está inserido dentro do sítio de clonagem do TOPO TA, que é capaz de degradar a lactose em D-galactose e D-glucose e em consequência, permite a visualização de colônias brancas quando o gene *lacZ* é ativo. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e as colônias brancas supostamente transformadas foram cultivadas e homogeneizadas em microtubos contendo 15µl de fenol:clorofórmio (1:1) e 15µl de solução contendo água e tampão de amostra (30% glicerol, 0,05% de azul de bromofenol, 70% água)(1:1) para gel de agarose. Os tubos foram agitados em vortex® e centrifugados a 12000xg por 2 minutos. Coletou-se a fase superior e submeteu-se à eletroforese em gel de agarose a 0,7% (m/v) com voltagem de 100 V por 1 hora.

As colônias visualizadas no gel de agarose que apresentaram peso molecular maior quando comparados ao controle foram consideradas transformadas, ou seja, portavam o inserto junto ao plasmídeo, e as mesmas foram inoculadas em meio líquido LB contendo 50 µg.mL⁻¹ de canamicina para a extração de plasmídeo. A extração de plasmídeo foi realizada utilizando-se o kit GFX™ *Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham bioscience). Após a obtenção e quantificação dos plasmídeos, os mesmos foram submetidos a digestão com o uso de enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I(Invitrogen®). A reação foi realizada contendo 5µl de DNA plasmidial (10ng), 2µl de Tampão React®3, 12µl de água Mili Q®, 0,5µl de enzima *Bam*HI(10U/ul) e 0,5µl de enzima *Kpn*I(10U/µl) As reações foram incubadas a 37°C por 2 h. Para o preparo do vetor de expressão PAE, o plasmídeo foi multiplicado em meio LB líquido suplementado com 100µg.mL⁻¹ de Ampicilina. Para a extração do plasmídeo e a clivagem seguiram-se o procedimento anterior. Após a clivagem, adicionou-se 1ul da enzima CIP (fosfatase alcalina) ao vetor PAE a fim de mantê-lo linearizado. Após a digestão do plasmídeo TOPO TA contendo os insertos PG, PE e Exp, realizou-se a eletroforese em gel de agarose 0,8% a voltagem de 100V por 1 hora. Os insertos digeridos foram purificados utilizando-se o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience®) e analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Os fragmentos foram ligados ao vetor de expressão PAE utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen®). A reação de ligação constituiu de 2ul de vetor PAE (10ng), 4µL de inserto, 1µL T4 DNA ligase (1U/µl), 4µL 5X Buffer e 9µL H₂O. A reação foi mantida por 1 hora a 16°C e complementada a 4°C *overnight*. Como controle da ligação, foi utilizado o plasmídeo pAE sem a presença do inserto.

2.2.1.3-Transformação de células competentes de *E.coli* BL21 pLyss

Para a transformação de células competentes de *E.coli* BL21 pLyss utilizou-se 1µl da reação de ligação (pAE PG, pAE PE e pAE Exp) homogeneizando-se em 50µl de células competentes de *E.coli* BL21 pLyss. Esta mistura foi colocada em cubetas de eletroporação previamente resfriadas em gelo, e submetidas à eletroporação em aparelho eletroporador marca Bio-Rad® com voltagem de 2,5KV. Após a eletroporação, adicionaram-se 450ul de meio LB líquido e os cultivos foram transferidos para tubos tipo Eppendorf® de 1,5ml. Incubou-se o material em agitador orbital a 225rpm a 37°C por 1h. Finalmente o cultivo foi realizado em agar LB sólido acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de Ampicilina e incubado a 37°C *overnight*.

As colônias que cresceram, que possuíam o plasmídeo recombinante em meio contendo Ampicilina, foram submetidas a um processo de triagem rápido pelo método Microprep (Jouglard et al. 2002). As colônias isoladas foram homogeneizadas com 15µl de fenol:clorofórmio (1:1) e 15µl de solução contendo água e tampão de amostra para gel de agarose. Os tubos foram agitados em Vortex® e centrifugados a 14000xg por 2 minutos. Coletou-se a fase superior para eletroforese em gel 0,8%(m/v). Para verificar a presença ou ausência do inserto no vetor, utilizou-se o plasmídeo pAE sem inserto como controle.

Após a confirmação da presença do inserto, os clones foram cultivados em 5ml de meio LB líquido suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de Ampicilina a 37 °C *overnight*. Dessa suspensão foram utilizados 3ml para extração de DNA plasmidial utilizando-se o kit GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham bioscience®) no qual o DNA resultante foi submetido a digestão com as enzimas de restrição utilizadas na clonagem (*Bam*HI e *Kpn*l(Invitrogen®)). O produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,8%(m/v). Após a verificação da presença dos insertos, os clones foram submetidos à um novo crescimento em meio LB líquido para posterior indução da expressão das enzimas de interesse PG, PE e Exp.

2.2.1.4- Indução da expressão das proteínas recombinantes PG, PE e Exp no vetor de expressão pAE.

Para a indução da expressão, um pré-inóculo das proteínas recombinantes PG, PE e Exp no vetor de expressão pAE contendo 20mL de meio LB líquido contendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina previamente crescido a 37°C, foi adicionado a 200mL de meio LB líquido contendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e mantido a 37°C até atingir uma DO_{600} 0,8 - 1,0. Após, adicionou-se IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 1mM deixando-se por 3-4 horas para indução da expressão das proteínas-alvo. Alíquotas de 1ml do cultivo foram coletadas para realização do teste de solubilidade. Esse teste mostrou que todas as proteínas geradas mostraram-se insolúveis, ou seja, que a expressão não foi detectada no sobrenadante da centrifugação. Passado esse período, o cultivo foi centrifugado em centrífuga Sorvall RC-6 a 4°C a 10000xg por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado, recuperando o precipitado para purificação.

2.2.1.5 - Purificação de proteínas recombinantes insolúveis

As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando o sistema de purificação automatizado ÄKTA prime (Amershan Biosciences®).

Os precipitados da indução da expressão dos clones (pAE + EXP; pAE + PG ; pAE + PE) foram utilizados para purificação das proteínas recombinantes. Os precipitados originados dos cultivos com volume de 200ml foram dissolvidos em 30 mL de solução Akta-Wash (uréia 8 M; NaH_2PO_4 200 mM; NaCl 0,5 M; imidazole 5mM pH 8,0) e mantido sob agitação por 1h à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram lisadas por sonicação por 3 ciclos de 10 minutos. O material foi centrifugado a 4 °C a 10000xg por 30 minutos, seguindo-se a filtração do sobrenadante com filtro filtro 0,8 μm (Millipore®). O filtrado foi submetido à purificação por cromatografia por afinidade.

O sistema de purificação automatizado Akta-Prime (Amersham bioscience®) possui uma coluna de purificação com uma resina carregada com níquel (Ni^{2+})-Sepharose na qual as proteínas fusionadas com uma cauda poli-Histidina são retidas na coluna. As amostras descritas no item anterior contendo os genes de interesse da

PG, PE e Exp, e clonados em vetor de expressão pAE, foram eluídas com um gradiente de imidazole, em tampão Akta elution (Uréia 8M; NaH₂PO₄ 200 mM; NaCl 0,5 M; Imidazole 200mM pH 8,0). As proteínas eluídas foram coletadas em frações de 1ml e submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12%. As amostras foram dialisadas em Tampão PBS-T 1X a 4C por um período de 72 horas sendo quantificadas pelo método de Bradford (1976). Para a verificação da presença das proteínas, foi executada uma eletroforese dessas proteínas recombinantes em gel SDS-PAGE 12%. Para a validação do resultado da expressão protéica, as proteínas recombinantes foram transferidas para membranas de nitrocelulose, realizando-se teste com anticoporos monoclonais anti-histidina.

2.2.1.6 - Produção, caracterização e título de anticorpos policlonais

Após a quantificação das proteínas purificadas, realizou-se a inoculação em camundongos para produção de anticorpos policlonais. Foram utilizados 100µg de cada proteína (PG, PE e Exp), diluídas com 15% de coadjuvante hidróxido de alumínio (Al (OH)₃), com injeção via intramuscular. A coleta do soro com os anticorpos foi feita após 21 dias da primeira inoculação, quando também se aplicou uma segunda dose. Os anticorpos foram coletados 21 dias após a segunda inoculação.

O soro foi titulado por testes de ELISA. Placas de ELISA foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes em tampão carbonato bicarbonato pH=9,6 por 1 h a 37 °C. O soro foi diluído em proporções variando de 1:20 até 1:20480 em tampão PBS 1X (Tris 20mM; NaCl 0,137mM, pH 7,6) e incubados 1 h a 37°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T 1X (Tris 20mM; NaCl 0,137mM, Tween 0,1%, pH 7,6), após o qual foi adicionado anticorpo anti-mouse conjugado à HRP na diluição 1:2000. Essa reação foi incubada a 37°C por 1 h e, em seguida, lavada 5X com PBS-T1X(Tris 20mM; NaCl 0,137mM, Tween 0,1%, pH 7,6). Após, foi adicionado o subtrato para a peroxidase (H₂O₂, Tampão fosfato citrato pH 4,0, OPD(sigma[®])). As placas foram acondicionadas em ambiente escuro durante 15 min, previamente à leitura a 450nm, em um leitor de placas ELISA. O título médio para os três recombinantes (PG, PE e Exp) foi 1:10240.

2.3 - Western blot

As proteínas foram extraídas a partir de 0,5g de polpa macerada em N₂ líquido adicionando-se 1mL de solução (40mM fosfato de sódio pH 7,0; 3mM EDTA, 1mM DTT) segundo método descrito por Obenland et al. (2003). A amostra foi mantida por 5 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugada durante 10 minutos a 12000x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 250µL de solução tampão (62,5mM TRIS-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol ; 1mM DTT). A amostra foi aquecida a 100°C durante 10 minutos e novamente centrifugada conforme descrito anteriormente. O sobrenadante foi recuperado e submetido à eletroforese SDS-PAGE.

As proteínas (10 µg por amostra) foram separadas em eletroforese SDS-PAGE em gel 12%(m/v), conforme descrito por Sambrook et al. (1988). A migração protéica foi realizada em cubas de eletroforese Bio-Rad[®] a 120V, em tampão (Tris-Base 25mM, Glicina 50mM e SDS 0,1%), por aproximadamente 2 horas.

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond[™]-ECL[™] Amersham bioscience[®]), utilizando-se equipamento para transferência Bio-Rad[®] com a utilização de Tampão de transferência 1X (Metanol 20%, Glicina 192mM, Tris 25mM) gelado a uma voltagem de 100V durante 1 hora. Após o término da transferência, as membranas foram submetidas ao bloqueio em solução PBS-T 1X(Tris 20mM; NaCl 0,137mM, Tween 0,1%, pH 7,6) contendo 5%(m/v) de leite em pó, por 24 horas à 4°C.

Após lavou-se três vezes as membranas com tampão PBS-T1X (Tris 20mM; NaCl 0,137mM, Tween 0,1%, pH 7,6), seguindo-se a incubação com os anticorpos policlonais específicos para cada proteína (PE, PG e EXP) diluídos em tampão PBS-T1X (diluição 1:2.000). A incubação foi realizada em temperatura ambiente 23±3°C por 1 h, sob agitação orbital. Em seguida, realizaram-se 3 lavagens com PBS-T1X (Tris 20mM; NaCl 0,137mM, Tween 0,1%, pH 7,6) por 5 minutos cada qual adicionou-se o anticorpo secundário ECL anti-mouse igG, Horseradish Peroxidase (GE Healthcare[®]) na concentração de 1:2000 em tampão PBS-T 1X (Tris 20mM; NaCl 0,137mM, Tween 0,1%, pH 7,6), incubando a 37°C por 1 h sob agitação. A membrana foi lavada 5X com

PBS-T1X (Tris 20mM; NaCl 0,137mM, Tween 0,1%, pH 7,6). A revelada e/ou detecção das proteínas na membrana foi realizada com os reagentes de quimioluminescência ECL™ Western blotting analyses system (GE healthcare®) conforme recomendações do fabricante.

2.4 - Lanosidade

A ocorrência de lanosidade foi avaliada visualmente, de acordo com o descrito por Girardi *et al.* (2005), tendo-se considerado fruto com esse distúrbio aquele que, por compressão entre os dedos, não apresentam liberação de suco. Os resultados foram expressos em percentual de frutos que apresentaram o distúrbio lanosidade.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seqüências dos clones (cDNAs) correspondentes às enzimas envolvidas na hidrólise da parede celular (PG, PE e Exp), expressos durante a maturação de pêssegos, foram isoladas utilizando-se a técnica de RT-PCR. As seqüências-alvo, obtidas no *GeneBank*, permitiu a confecção dos oligonucleotídeos no programa Vector NTI 9 (informax®), a partir do qual foi possível estimar o tamanho dos fragmentos a serem gerados nas amplificações de RT-PCR. Com o uso de oligonucleotídeos selecionados foi possível amplificarem-se fragmentos de aproximadamente 700 pb, 1400 pb e 462 pb, o que corresponde aos tamanhos já esperados para esses cDNAs (Figura 1).

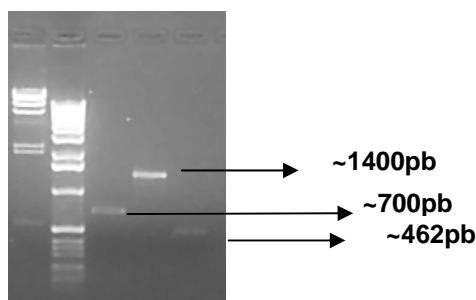


Figura 0—1- Produto da amplificação dos clones de DNA (cDNA) das enzimas PG, PE e Exp em gel de agarose a 1% (m/v) utilizando a técnica de RT-PCR. Pista 1- Marcador *M/HindIII*; Pista 2- Marcador DNA ladder 1Kb; Pista 3- Poligalacturonase (PG); Pista 4- Pectinesterase (PE); Pista 5- Expansina (Exp). As setas indicam o tamanho dos fragmentos amplificados.

Os fragmentos obtidos pela RT-PCR, correspondentes as três enzimas, PG, PE e Exp, contêm os sítios de restrição (*Bam*HI e *kpn*I), visando a clonagem, que foi realizada no plasmídeo TOPO TA e transferido para *E. coli*. A extração plasmidial e digestão com as enzimas de restrição correspondentes, gerou fragmentos do plasmídeo e dos insertos de interesse, todos com tamanho de acordo com o esperado (Figura 2). Os insertos obtidos da digestão e separados em eletroforese (Figura 4) foram recortados diretamente do gel e purificados utilizando-se o kit GFX™ (Amersham Bioscience®). O resultado da purificação é apresentado na Figura 3, onde observa-se somente a presença dos respectivos insertos.

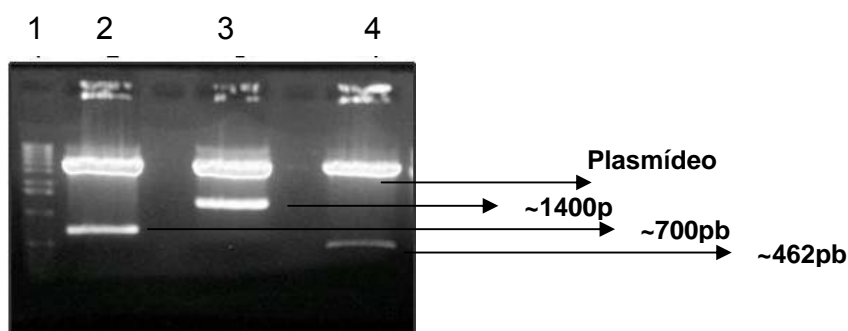


Figura 0—1 - Produto da digestão do plasmídeo TOPO-TA contendo os cDNAs PG, PE e Exp, com as enzimas de restrição *Bam*HI e *kpn*I. Pista 1- Marcador DNA ladder 1Kb; Pista 2- pTOPO PG, Pista 3- pTOPO PE; Pista 4- pTOPO Exp.

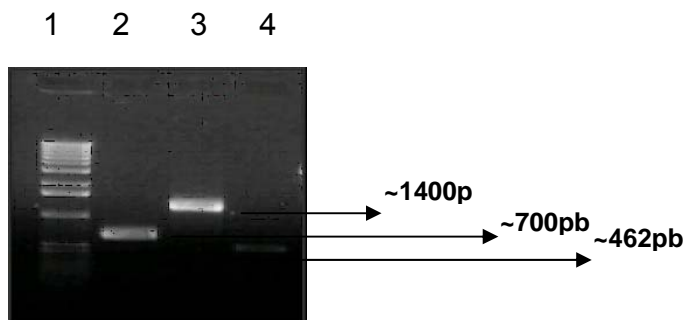


Figura 0—2 - Produto da purificação dos clones PG, PE e Exp, utilizando o kit GFX™ (Amersham Bioscience®). Pista 1- Marcador DNA ladder 1kb; Pista 2- PG; Pista 3- PE; Pista 4- Exp.

A disponibilidade de fragmentos purificados, com o tamanho esperado, e com as extremidades correspondentes às enzimas de restrição *BamHI* e *KpnI*, permitiu o preparo do vetor de expressão pAE (Figura 4) com os cDNAs. Verifica-se que houve a inserção dos cDNAs, já que a clivagem com as enzimas *BamHI* e *KpnI* resultou na separação dos fragmentos correspondentes aos cDNAs da PG, PE e Exp (Figura 5, pistas 2, 4 e 6), quando comparados às construções não digeridas (Figura 6, pistas 1, 3, 5). A presença de duas bandas em algumas amostras (Figura 5, pistas 1, 3, 5 e 7), pode ser explicada pela provável conformação do plasmídeo que, mesmo contendo o mesmo número de pares de base, pode migrar diferencialmente, em função de estar ou não numa forma mais ou menos espiralada (Sambrook et al. 1989).

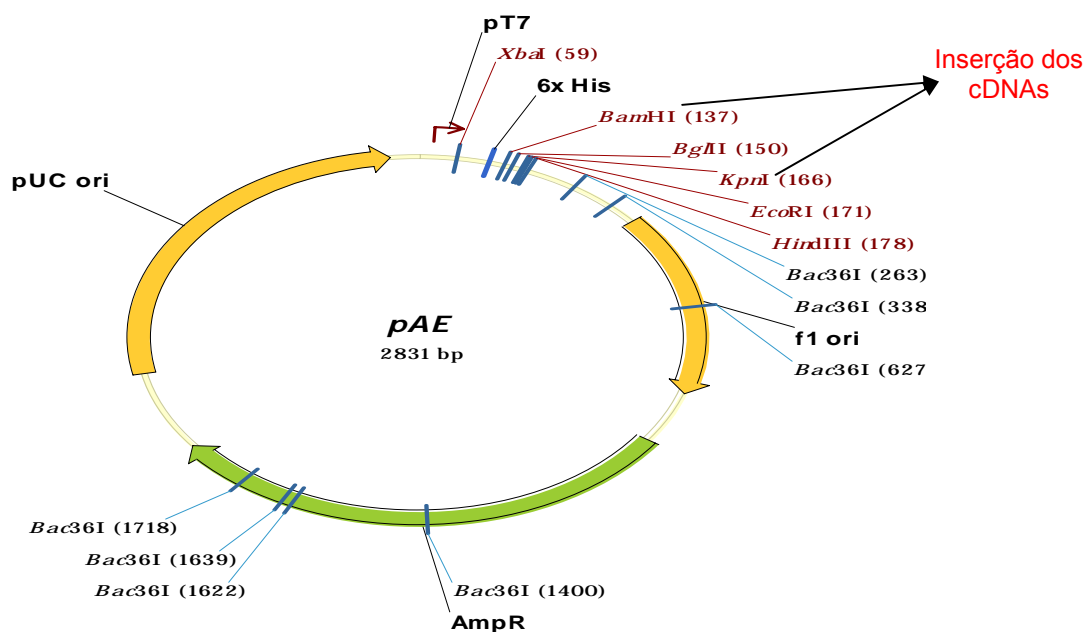


Figura 0—3 - Carta de restrição do plasmídeo pAE contendo os sítios de inserção dos cDNAs.

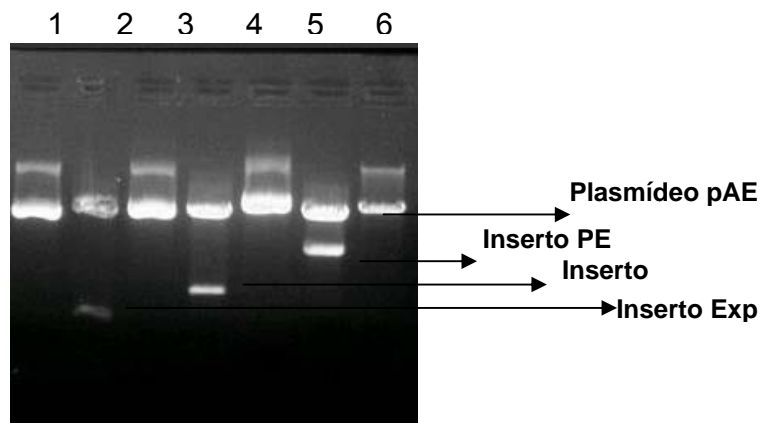


Figura 0—4 - Produto da digestão do plasmídeo pAE contendo os cDNAs PG, PE e Exp. Pista 1- Plasmídeo pAE Exp; Pista 2- Plasmídeo pAE Exp digerido; Pista 3- Plasmídeo pAE PG; Pista 4- Plasmídeo pAE PG digerido; Pista 5- Plasmídeo pAE PE; Pista 6- Plasmídeo pAE PE digerido; Pista 7- Plasmídeo pAE linearizado.

Os plasmídeos pAE, possuindo o inserto de cada gene, foram transferidos para a cepa *E.coli* pLyss BL21 (D3) por eletroporação e, em seguida, cultivadas em meio sólido LB. As colônias brancas, que correspondem às bactérias portadoras dos insertos de interesse, foram selecionadas. A multiplicação das bactérias que portavam os insertos foi realizada em meio LB líquido. Após a indução do promotor T7 RNA polimerase pela adição de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), verificou-se que houve a tradução de peptídeos com massa molecular aproximada correspondente aos cDNAs em estudo. Mais detalhadamente, detectaram-se bandas fortes de aproximadamente 27 kDa, 50 kDa e 17 kDa (Figura 6) que correspondem, provavelmente, à transcrição dos cDNAs de PG (700pb), PE (1400pb) e Exp (462pb), adicionado de 6 histidinas na extremidade N-terminal, conforme previsto na carta do plasmídeo pAE. Essas mesmas proteínas extraídas foram submetidas à purificação em sistema de cromatografia AKTA-Prime[®], com o auxílio de colunas de cromatografia de afinidade HiTrap[™] Ni-Sepharose (amersham bioscience[®]). Essa afinidade é obtida pela seqüência de poli-histidina do inserto com o cation Ni²⁺ da coluna de cromatográfica. A presença dessa seqüência de histidinas permitiu a purificação parcial das proteínas recombinantes em coluna de afinidade (Figura 7). Nessa imagem verifica-

se que a purificação parcial ocorreu, tendo-se separado do extrato protéico total (Figura 7, pistas 3, 5 e 7), as proteínas recombinantes (Figura 7, pistas 4, 6 e 8). A pista 9 corresponde ao extrato protéico bruto expresso no cultivo com pAE sem cDNAs inseridos.

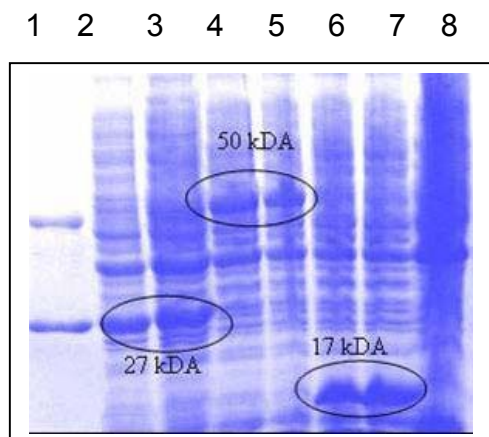


Figura 0—5 - Expressão protéica em SDS-PAGE 12% de *E.coli* BL21 pLyss (D3) contendo o plasmídeo pAE com os clones PG, PE e Exp em Pista 1- Marcador caseiro; Pista 2 e 3- Expressão pAE PG; Pista 4 e 5- Expressão pAE PE; Pista 6 e 7- pAE Exp; Pista 8- Expressão *E.coli* BL 21 pLyss (D3).

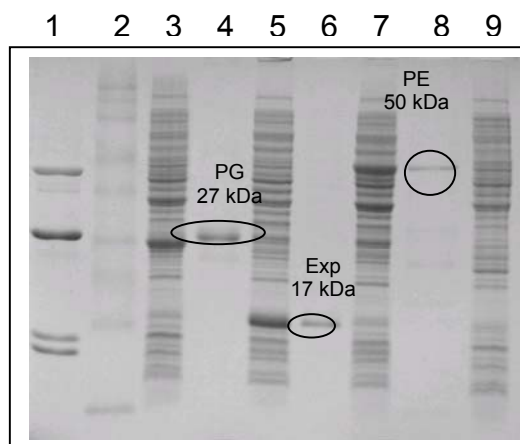


Figura 0—6 - Produto da purificação das proteínas recombinantes PG, PE e Exp em SDS-PAGE 12%. Pista 1- Marcador molecular; Pista 2- Marcador Bench Mark protein Ladder (Invitrogen®); Pista 3- Clone *E. coli* pLyss BL 21 pAE PG; Pista 4- PG recombinante purificada; Pista 5- *E. coli* pLyss BL 21 pAE Exp; Pista 6- Exp recombinante purificada; Pista 7- *E. coli* pLyss BL 21 pAE PE; Pista 8- PE recombinante purificada; Pista 9- *E. coli* pLyss BL 21 pAE.

A confirmação de que as proteínas eluídas em coluna de afinidade continham

efetivamente o fragmento poli-histidina foi efetivada com a reação de *western blot*, com as proteínas purificadas, utilizando-se anticorpos monoclonais anti poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma[®]). O resultado desse teste imunológico permitiu uma avaliação altamente positiva quanto à afinidade dos anticorpos pelas proteínas e ratificou-se o bom funcionamento e eficiência do método, embora tenha-se observado-se algumas bandas de detecção inespecíficas de menor intensidade, que não comprometem a técnica (Figura 7). Esse fato é comum nesse tipo de avaliação já que é possível que os anticorpos monoclonais anti-histidina possam reconhecer seqüências menores ou maiores do que 6 histidinas e/ou é possível que haja produtos de degradação das proteínas recombinantes contendo a extremidade histidina, sendo reconhecidos pelos anticorpos e detectados como peptídeos de menor massa molecular.

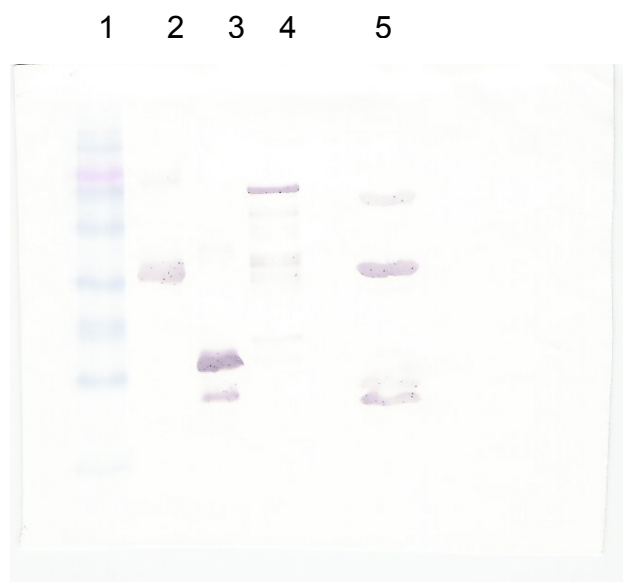


Figura 0—7 – Imunodeteção por *Western blot* das proteínas recombinantes PG, PE e Exp, com o uso de anticorpos monoclonais anti-cauda poli-histidina conjugados com peroxidase (Sigma). Pista 1- Marcador Bench Mark Protein Ladder; Pista 2- PG recombinante; Pista 3- Exp recombinante; Pista 4- PE recombinante; Pista 5- Marcador anti-histidina.

As proteínas purificadas foram submetidas à diálise para eliminação da uréia presente no tampão utilizado na purificação das proteínas. As proteínas dialisadas foram utilizadas na inoculação de camundongos para obtenção de anticorpos policlonais contra as proteínas em estudo (PG, PE e Exp). A coleta do soro com os anticorpos foi realizada 21 dias após a primeira inoculação, quando também se aplicou uma segunda dose. Fez-se também uma coleta aos 21 dias após a segunda inoculação. O título do soro foi determinado pelo método ELISA, obtendo-se título médio para os três recombinantes (PG, PE e Exp) de 1:10240.

Em pêssegos “Chiripá”, colhidos no estágio meio-maduros e mantidos por 8 dias a $23\pm 2^\circ$ C e 70 a 75% de UR, verificou-se que a máxima imunoreação dos anticorpos anti-PG ocorreu no 3º e 4º dias após a colheita (Figura 9), período em que normalmente detectam-se as maiores taxas de redução da firmeza de polpa em pêssegos dessa cultivar não armazenados sob refrigeração (Nava & Brackmann, 2002, Rombaldi et al. 2002; Girardi et al. 2002). No que concerne à PE, houve detecção da proteína desde a colheita até o 4º dia, com máxima expressão no 3º dia (Figura 10). Como é amplamente conhecido que durante o amadurecimento de pêssegos há redução da firmeza de polpa, decorrente, majoritariamente, da solubilização de pectinas, e que isso é resultante da ação de PGs, PEs, Exps e outras enzimas (Obenland et al. 2003; Sitrit & Bennet, 1998; Morgutti et al. 2006), a detecção das respectivas proteínas era esperada. Isso ocorreu para PG e PE, mas não para Exp. Segundo Ben Arie & Sonogo, (1980), Zhou et al. (2000), as PEs têm ação preparatória à das PGs, ou seja, as PEs atuam na desmetilação e rompendo ligações ésteres, facilitando a ação de endo e exo-PGs, hidrolisando e solubilizando pectinas, com a conseqüente redução da firmeza de polpa e aquisição da suculência (Ben Arie & Sonogo, 1980; Zhou et al. 2000; Brummell et al. 2004). Segundo Brummell et al. (1999) e Obenland et al. (2003), as expansinas podem agir como moduladores influenciando a degradação de pectinas por alterar a maneira da qual a PG interage com o substrato péctico durante a maturação. Os resultados obtidos neste trabalho, corroboram parcialmente as citações feitas anteriormente, tendo em vista que houve expressão prévia (1º e 2º dias) e concomitante (3º e 4º dias) da PE (Figura 10) em relação à PG (Figura 9), mas sem presença de Exp (dados não apresentados). Outro aspecto importante é que a maioria dos trabalhos (Zhou et al.

2000, Brummell et al. 2004 a, b, Hayama et al. 2006), citam que, durante o amadurecimento normal de frutos, há uma maior expressão proporcional da PG do que PE. Essas afirmativas foram feitas a partir de resultados obtidos pelas técnicas de RT-PCR, *Northern blot* ou atividade enzimática. Isso também foi aqui demonstrado pela técnica de *Western blot* (Figuras 9 e 10).

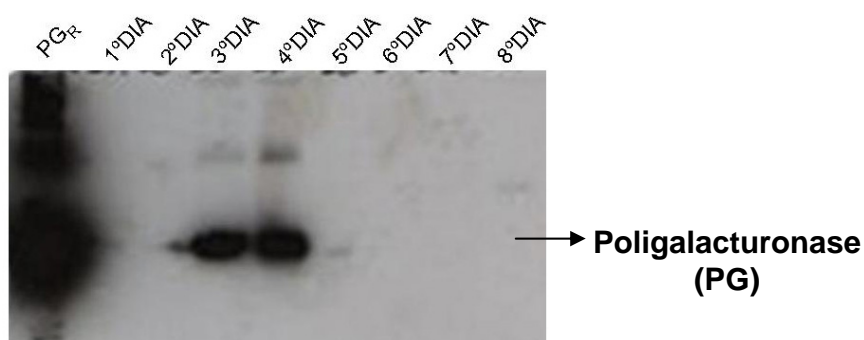


Figura 0—8 – Imunodeteccção por *Western blot* com o uso de anticorpos policlonais anti-poligalacturonase (PG) durante a maturação de pêesegos. Na parte superior são indicados os dias após a colheita e a proteína recombinante (PG_R).

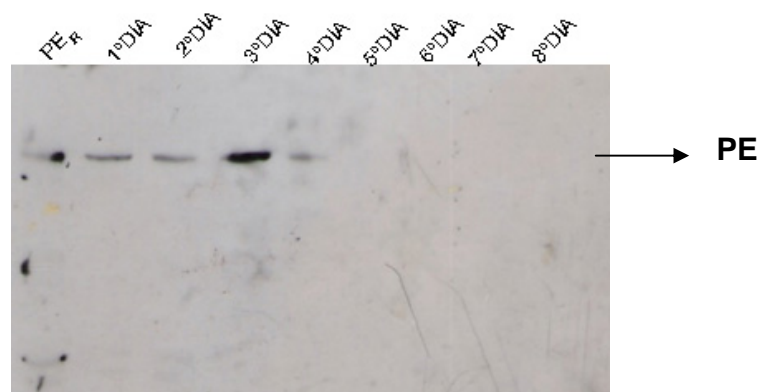


Figura 0—9 - Imunodeteccção por *Western blot* com o uso de anticorpos policlonais anti-Pectinesterase (PE) durante a maturação de pêesegos. Na parte superior são indicados os dias após a colheita e a proteína recombinante (PE_R).

Visando estudar o provável envolvimento da PG , PE e Exp na ocorrência de lanosidade em pêssegos “Chiripá”, detectaram-se essas proteínas nos frutos submetidos a condições que favorecem e que previnem a ocorrência desse distúrbio. Girardi et al. (2005) verificaram que o armazenamento de pêssegos “Chiripá”, por 30 dias em AR, resulta na ocorrência de lanosidade na totalidade dos frutos nos primeiros dias após a retirada da câmara fria. Neste trabalho, confirmou-se esse comportamento, ou seja, 90% dos frutos apresentaram-se com o sintoma 2 dias após a retirada da câmara fria (Figura 11). Ao avaliar-se a expressão das proteínas PG e PE (Figura 11A e B) e Exp (não apresentado) nesses frutos, verificou-se que, logo após a retirada dos frutos da câmara fria, não houve imunodeteção da PG (Figura 11A), mas a PE estava presente (Figura 11B). A partir de então, houve forte expressão de PG até o 8º dia de avaliação, e a PE foi detectada até o 6º dia de avaliação. No que concerne à ocorrência de lanosidade, essa foi detectada em 25% dos frutos na retirada da câmara fria, e atingiu 90% dos pêssegos no 2º e 4º dias, reduzindo para 50% e 45%, no 6º e 8º dias (Figura 11). Esse comportamento confirma trabalhos prévios (Brackmann & Nava, 2002; Rombaldi et al. 2002; Girardi et al. 2005) que demonstraram que o AR não é um bom método de conservação para pêssegos “Chiripá”, e que o descompasso na expressão entre PG e PE (Zhou et al. 2000; Girardi et al. 2005), provavelmente favoreça a ocorrência do distúrbio. Essa afirmativa é feita com base nas observações feitas logo após a retirada dos frutos da câmara fria, momento em que não se detectou a proteína PG, mas se detectou a PE. Embora neste trabalho não tenha-se determinado a atividade dessas enzimas, Girardi et al. (2005) já demonstraram que esse descompasso também ocorre nessa variável.

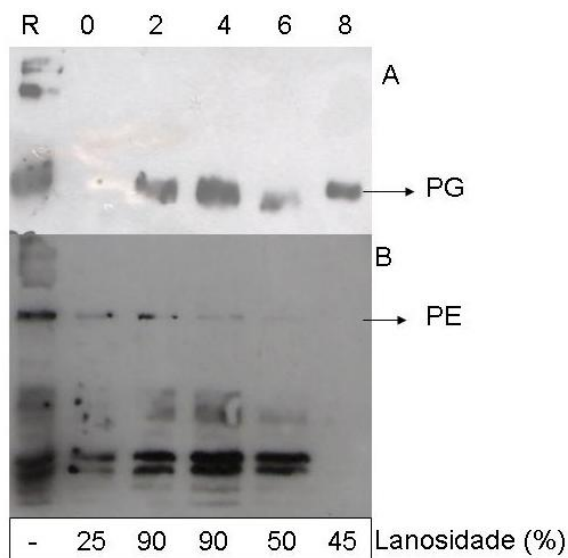


Figura 0—10 – Imunodecção de PG (A) e de PE (B), e ocorrência de lanosidade em pêssegos “Chiripá” armazenados por 30 dias em atmosfera refrigerada (AR) e mantidos por 0, 2, 4, 6 e 8 dias em temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$). A proteína recombinante (R) esta indicada na figura.

Complementarmente, comprova-se que o emprego de baixas temperaturas tem ação mais efetiva no controle da tradução de PG do que PE. Zhou et al. (2000), Nava & Brackmann, (2002), Rombaldi et al. (2002), Obenland et al. (2003); Girardi et al. 2005; Lurie & Crisosto, 2005, citam que ao associar-se ao AR, o controle da atmosfera (AC), previne-se a ocorrência de lanosidade. Girardi et al. (2005), por exemplo, verificaram que o emprego de AC em pêssegos “Chiripá”, resulta num melhor controle da atividade PE durante o armazenamento e após a retirada da câmara fria, prevenindo o problema. Este trabalho, complementar ao de Girardi et al. (2005), comprova que a AC previne a ocorrência de lanosidade e demonstra que, após a retirada dos frutos da câmara fria, há forte imunoreação com anticorpos anti-PG, em maior intensidade até o 4^o dia (Figura 12A). No caso da PE, também há detecção, mas em menor intensidade, sugerindo que nesses frutos mantenha-se uma proporção PG/PE mais elevada logo após a retirada da câmara (Figura 12A e 12B), do que nos armazenados em AR (Figura 11A e 11B).

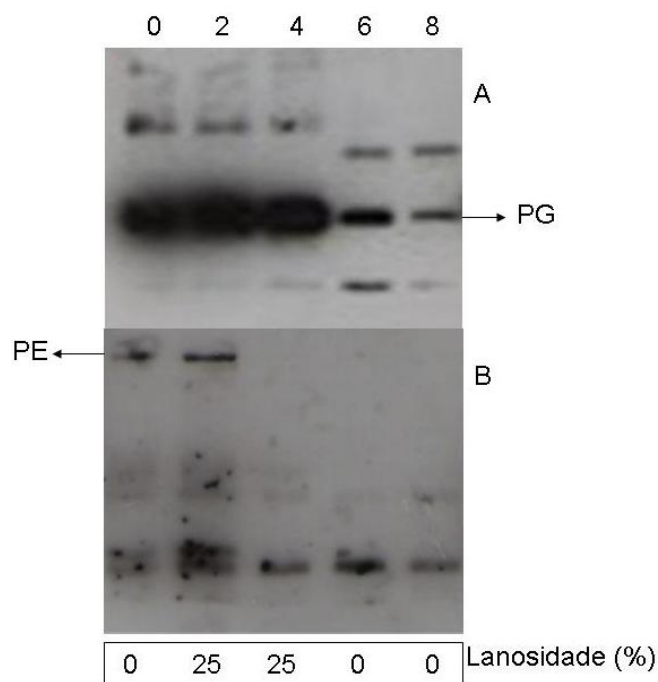


Figura 0—11 – Imunodecção de PG (A) e de PE (B), e ocorrência de lanosidade em pêssegos “Chiripá” armazenados por 30 dias em a tmosfera controlada (2 kPa de O₂ e 5 kPa de CO₂) e mantidos por 0, 2, 4, 6 e 8 dias em temperatura ambiente (23±2 °C).

Em 2007, Zanuzo et al. (2007), buscando retardar a colheita de pêssegos “Chiripá” com a aplicação de ácido giberélico, verificaram que essa resposta não ocorreu, mas os frutos tratados com esse fitoregulador apresentaram maior tamanho e menor suscetibilidade à lanosidade quando armazenados em AR. Neste trabalho confirmou-se que a aplicação de AG₃ exerce efeito preventivo na ocorrência da lanosidade, e que, mesmo com 30 dias de AR, a expressão da PG, após a retirada dos frutos da câmara fria, foi intensa (Figura 13), à semelhança do que ocorreu com os frutos armazenados em AC (Figura 12). A imunoreação com anticorpos anti-PE foi intensa (Figura 13), mas, mesmo assim, preveniu-se a ocorrência de lanosidade.

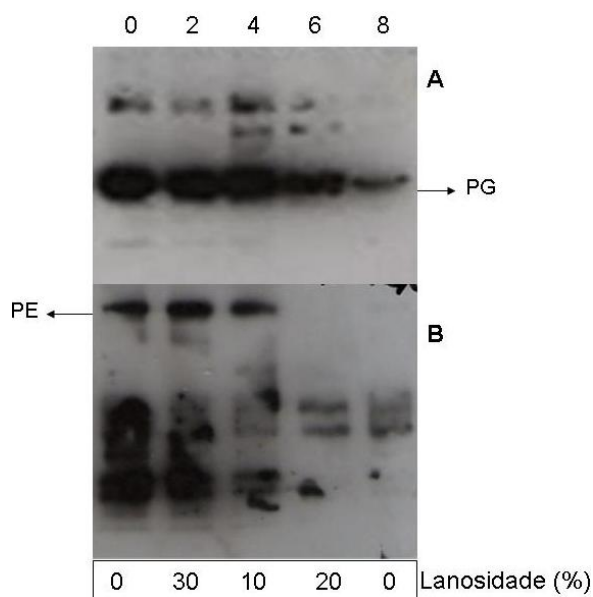


Figura 0—12 – Imunodecção de PG (A) e de PE (B), e ocorrência de lanosidade em pêssegos armazenados por 30 dias em atmosfera refrigerada com aplicação de AG₃, mantidos por 0, 2, 4, 6 e 8 dias em temperatura ambiente (23±2 °C).

O mecanismo de ação do AG₃ na prevenção do problema não foi esclarecido, mas acredita-se, de acordo com os dados prévios de Ju et al. (1999), que estimule a divisão celular durante a fase de crescimento, pela indução equilibrada de genes de PGs e PEs, dentre outros envolvidos na hidrólise de componentes da parede celular e endo-esqueleto, resultando em frutos com metabolismo da parede celular mais equilibrado após a colheita e AR. Neste trabalho pôs-se em evidência que a aplicação de AG₃ resultou em elevada expressão de PE e também de PG.

DISCUSSÃO

Os pêssegos “Chiripá” são sensíveis à ocorrência de lanosidade quando são armazenados em AR, por períodos superiores a 20-30 dias, resultando em frutos sem suculência, depreciando a qualidade sensorial e o valor comercial (Girardi al., 2005). Isso foi comprovado, mais uma vez, tendo-se detectados 90 % de frutos com o sintoma após 30 dias de AR e 2 dias em condições de comercialização (Figura 11). Vários trabalhos (Zhou et al. (2000); Nava & Brackmann, (2002), Rombaldi et al. (2002);

Girardi et al. (2005); Lurie & Crisosto, (2005); Hayama et al. (2003), (2006)) têm abordado essa temática, buscando prevenir o distúrbio, mas a(s) causa(s) exata(s) não foram elucidadas. A maioria dos trabalhos infere que, provavelmente, esse distúrbio seja o resultado do descompasso entre a atividade de enzimas PGs e PEs (Ben Arie & Sonego, 1980; Zhou et al. 2000; Zhou et al. 2001; Girardi et al. 2005), a partir de avaliações da expressão de mRNAs correspondentes a essas enzimas (Liguori et al. 2004; Hayama et al. 2006; Callahan et al. 2004) , ou pela mensuração da atividade enzimática aparente. Buscando otimizar essas técnicas para pêssegos “Chiripá”, verificou-se que o estudo da expressão transcricional dos genes PG e PE é dificultado não havendo reprodutibilidade da técnica de RT-PCR (dados não apresentados). Embora essa técnica seja amplamente aplicada no estudo da expressão de genes, em outros materiais ricos em compostos fenólicos e polissacarídeos, têm sido relatadas dificuldades para a otimização dos procedimentos e reagentes (Corrent, informação pessoal). Esse problema ainda não foi solucionado para pêssego. Mesmo tendo-se utilizados métodos publicados (Wan and Wilkins, 1994; Ikoma et al. 1996) para esse fruto, não houve reprodutibilidade de resultados. Para repetições uma mesma amostra, tem-se obtido resultados variados, o que vem dificultando o uso dessa estratégia. A atividade enzimática aparente também vem sendo criticada devido à falta de reprodutibilidade, especialmente em frutos que apresentam distúrbios fisiológicos como é o caso de pêssegos com lanosidade, nos quais o processo de extração é dificultado. Em função dessas dificuldades, e por disporem-se de cDNAs de PG, PE e Exp de pêssegos, optou-se por produzirem-se anticorpos policlonais dirigidos contra as respectivas proteínas. Com isso, pela primeira vez, obtiveram-se as proteínas recombinantes PG, PE e Exp (Figuras 6, 7 e 8), e os anticorpos policlonais capazes de reagir com essas proteínas (Figuras 9 e 10). Ao serem testados em extratos protéicos de pêssegos “Chiripá”, verificou-se que os anti-PG e anti-PE foram capazes de detectar proteínas nessas amostras. No entanto, não houve reação com o anti-Exp, provavelmente devido à baixa expressão de genes dessa proteína.

Com o intuito de elucidarem-se as causas da lanosidade, utilizaram-se os anticorpos anti-PG, anti-PE e anti-Exp, frente a extratos protéicos de pêssegos “Chiripá” submetidos a condições que favorecem, ou seja, o AR (Zhou et al. 2000; Rombaldi et

al. 2002;) e previnem como o AC e a aplicação de AG_3 (Ju et al. 1999; Rombaldi et al. 2002; Nava & Brackmann, 2002; Girardi et al. 2005) a ocorrência do distúrbio em estudo. Nesse estudo, verificou-se que o AR agiu mais fortemente na expressão da PG do que da PE, tendo em vista que na retirada dos frutos da câmara fria, não detectou-se a proteína PG, mas sim a PE (Figuras 11A e 11B). É citado também que métodos que favoreçam a atividade PE são favoráveis à ocorrência de lanosidade (Zhou et al. 2000; Girardi et al. 2005). Neste trabalho não avaliou-se a atividade enzimática, mas apenas a presença da proteína, tendo-se observado que o tratamento com maior incidência de lanosidade é precedido de uma maior imunoreação com anti-PE do que com o anti-PG, corroborando com a afirmativa dos autores precedentes (Zhou et al. 2000; Girardi et al. 2005). A partir do 2º dia após o AR houve forte imunoreação com os anti-PG, o que resultou em redução dos percentuais de frutos com lanosidade a partir do 4º dia. Brackmann et al. (2003) verificaram que pode haver reversibilidade da lanosidade prolongando-se o período de estocagem após o AR, mas destacam que esse procedimento normalmente é acompanhado de elevada incidência de podridões. Para esses autores, essa reversão é mais rápida e eficiente em frutos armazenados em AC. Isso foi reproduzido neste trabalho (Figura 12). Em pêssegos “Chiripá” armazenados em AC, a expressão da proteína PG imediatamente após a retirada da câmara fria foi intensa e assim se manteve até o 4º dia de avaliação (Figura 12A), com intensidade maior do que a proteína PE (Figura 12B). Como consequência, obtiveram-se menores percentuais de frutos com lanosidade quando o armazenamento foi realizado em AC (Figura 12) do que em AR (Figura 11). O perfil de evolução das proteínas PG e PE dos frutos armazenados em AC (Figura 12), embora em intensidades diferenciadas, assemelhou-se mais ao do amadurecimento dos frutos sem AR (Figuras 9 e 10), do que os armazenados em AR (Figura 11). Isso sugere que a AC permite a retomada do processo de amadurecimento dos frutos de modo mais harmonizado do que o AR, ao menos para períodos de 30 dias de AC e AR e mais oito dias em condições de simulação de comercialização.

Pêssegos “Chiripá” tratados com AG_3 no estágio de crescimento correspondente ao início da fase de endurecimento do caroço mostraram-se menos problemáticos em termos da ocorrência de lanosidade (Figura 15) do que os não tratados (Figura 13). Na

retirada da câmara fria, em pêssegos não tratados com AG₃ não houve detecção de PG, enquanto nos tratados a imunoreação foi intensa. Provavelmente, a forte presença dessa proteína tenha equilibrado a também forte expressão da PE nesses frutos, prevenindo-se a ocorrência de lanosidade. Nos pêssegos não tratados os percentuais de frutos com lanosidade atingiram valores de até 90% (Figura 12), e nos tratados, 30%.

CONCLUSÕES

Os anticorpos produzidos a partir de proteínas recombinantes correspondentes aos cDNAs da poligalcturonase (anti-PG) e da pectilmetilesterase (anti-PE) são eficientes para a detecção das respectivas proteínas em pêssegos “Chiripá” durante a maturação, e após o armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada.

As condições de armazenamento de pêssegos que resultam em redução da expressão da proteína PG, sem interferir nos níveis de expressão de PE, favorecem a ocorrência de lanosidade (AR).

Os pêssegos armazenados nas condições de AC ou submetidos à aplicação de AG₃ previnem a ocorrência da lanosidade.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão das bolsas de estudo (Demanda Social e Estágio Doutoral), e ao CNPq pelo auxílio financeiro à pesquisa.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARTÉS, F., CANO, A., FERNANDEZ-TRUJILLO, J.P., 1996. Pectolytic enzyme activity during intermittent warming storage of peaches. **J. Food Sci.** 61, 311–313.

BRACKMANN, A.; STEFFENS, C.A; GIEHL, R. F. H. 2003. Storage of 'Chimarrita' peach in controlled atmosphere and under ethylene absorption. **Cienc. Rural**,v. 33, n. 3,. 431-435.

BRUMMELL, D.A., CIN, V.D., CRISOSTO, C.H., LABAVITCH, J.M., 2004a. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. **J. Exp. Bot.** 55, 2029–2039.

BRUMMELL, D.A., CIN, V.D., LURIE, S., CRISOSTO, C.H., LABAVITCH, J.M., 2004b. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. **J. Exp. Bot.** 55, 2041–2052.

BRUMMELL, D. A., HARPSTER, M. H., DUNSMUIR, P., 1999. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. **Plant Mol. Biol.** 39, 161-169.

CALLAHAN, A.M., SCORZA, R., BASSETT, C., NICKERSON, M., ABELES, F.B., 2004. Deletions in an endopolygalacturonase gene cluster correlate with non-melting flesh texture in peach. **Func. Plant Biol.** 31, 159–168.

FERNANDEZ-TRUJILLO, J.P., CANO, A., ARTES, F., 1998. Physiological changes in peaches related to chilling injury and ripening. **Postharvest Biol. Technol.** 13, 109–119.

GIRARDI, C.L.; CORRENT, A.; LUCCHETTA, L.; ZANUZO, M.R.; BRACKMANN, A.; TWYMAN, R.M.; NORA, L.; NORA, F. SILVA, J.A.; ROMBALDI,C.V. 2005. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripá) during cold storage. **Postharvest Biol. Technol.**, Netherland, v. 38, n. 1, p.25-33.

GLOVER,H., BRADY,C.J., LEE,E. AND SPEIRS,J. 1996. Multiple pectin esterase genes are expressed in ripening peach fruit: Nucleotide sequence of a cDNA encoding peach pectin esterase. **Plant Physiol.** 112, 864-864.

HAYAMA, H., SHIMADA, T., HAJI, T., ITO, A., KASHIMURA, Y., YOSHIOKA, H., 2000. Molecular cloning of a ripening-related expansin cDNA in peach: evidence for no relationship between expansin accumulation and change in fruit firmness during storage. **J. Plant Physiol.** 157, 567 – 573.

HAYAMA H, TATSUKI M, ITO A, KASHIMURA Y. 2006. Ethylene and fruit softening in the stony hard mutation in peach. **Postharvest Biol. Technol.** 41, 16–21.

HU, C. G.; HONDA, C.; KITA, M.; ZHANG, Z.; TSUDA, T.; MORIGUCHI, T. A. 2002. Simple Protocol for RNA Isolation from Fruit Trees Containing High Levels of Polysaccharides and Polyphenol Compounds. **Plant Mol. Biol. Reporter**. 20, 69a–69g.

IKOMA, Y., YANO, M., OGAWA, K., YOSHIOKA, H., XU, Z. C., HISADA, S., OMURA, M., MORIGUCHI, T., 1996. Isolation and evaluation of RNA from polysaccharide-rich tissues in fruit for quality by cDNA library construction and RT-PCR. **J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.** 64, 809-814.

JU, Z.; DUAN, Y.; JU, Z. 1999. Combinations of AG3 and AVG delay fruit maturation, increase fruit size and improve storage life of 'Feicheng' peaches. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Kent, v. 74, n. 5, p. 579-583.

JU, Z., DUAN, Y., JU, Z., 2000. Leatheriness and mealiness of peaches in relation to fruit maturity and storage temperature. **J. Hort. Sci. Biotech.** 75, 86–91.

LAGOS, L. L. 2000. Avanço na conservação de frutas de caroço. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO. PÊSSEGOS, NECTARINAS e AMEIXAS. 2000**. Porto Alegre, RS. Anais, Porto Alegre:[s.n.] p. 95-104.

LESTER DR, SPEIRS J, ORR G, BRADY C. 1994. Peach (*Prunus persica*) endopolygalacturonase cDNA isolation and mRNA analysis in melting and nonmelting peach cultivars. **Plant Physiol.** 105(1): 225-231.

LIGUORI G, WEKSLER A, ZUTAHY Y, LURIE S, KOSTO I. 2004. Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of melting flesh peaches and nectarines. **Postharvest Biol. and Technol.** 31, 263–268.

Lill, R.E., O'Donoghue, E.M., King, G.A., 1989. Postharvest physiology of peaches and nectarines. **Hortic. Rev.** 11, 413–452.

LURIE, S., 1992. Controlled-atmosphere storage to decrease physiological disorders in nectarines. **Int. J. Food Sci. Technol.** 27, 507–514.

Lurie, S. & Crisosto, C. H. 2005. Chilling injury in peach and nectarine. **Postharvest Biol. Technol.**, v. 37, 3, 195-208.

MARTÍNEZ-ROMERO, D.; VALERO, D.; SERRANO, M.; BURLÓ, F.; CARBONELL, A.; BURGOS, L.; RIQUELME, F. 2000. Exogenous polyamines and gibberellic acid effects on peach (*Prunus persica* L.) storability improvement. **J. Food Science**, v.65, n.2, p. 288-294.

NAVA, G. A. & BRACKMANN, A. 2002. Armazenamento de pêssegos (*Prunus persica* (L.) Batsch), cv. Chiripá, em atmosfera controlada. **Rev. Brasileira Fruticultura**, v. 24, n. 2, p.328-332.

OBENLAND, D.M., CARROLL, T.R., 2000. Mealiness and pectolytic activity in peaches and nectarines in response to heat treatment and cold storage. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 125, 723–728.

OBENLAND, D.M., CRISOSTO, C.H., ROSE, J.K.C., 2003. Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches. **Postharvest Biol. and Technol.** 29, 11–18.

ROMBALDI, C. V., SILVA, J. A., MACHADO, L. B., PARUSSOLO, LUCHETTA, L., ZANUZO, M. R., A., GIRARDI, C. L., CANTILLANO, R. F. 2002. Storage of 'Chiripa' peach in controlled atmosphere. **Científica Rural.** 31, pp. 43-47.

SITRIT, Y., BENNETT, A., 1998. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a re-examination. **Plant Physiol.** 116, 1145–1150.

WAN CY, WILKINS TA. 1994. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Analytical Biochemistry**, 223, 7-12.

WILLS, R.; MCGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. 1998. Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruits, vegetables and ornamentals. 4th ed. **Sydney: University of New South Wales Press, 262 p.**

ZANUZO, M. R.; ROMBALDI, C. V.; SILVA, J. A.; FERRAREZE, J. P.; DAL CERO, J.; PEGORARO, C.; NORA, L. 2007. Efeito do ácido giberélico sobre a qualidade e lanosidade de pêssegos conservados sob refrigeração. **Acta Horticulturae.** (no Prelo)

ZHOU, H.W., DONG, L., BEN-ARIE, R. LURIE, S., 2001. The role of ethylene in the prevention of chilling injury in nectarines. **J. Plant Physiol.** 158, pp. 55–61.

ZHOU, H.-W., SONEGO, L., KHALCHITSKI, A., BEN-ARIE, R., LERS, A., LURIE, S., 2000a. Cell wall enzymes and cell wall changes in 'Flavortop' nectarines: mRNA abundance, enzyme activity, and changes in pectic and neutral polymers during ripening and in woolly fruit. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 125, 630–637.

ZHOU, H.W., LURIE, S., LERS, A., KHATCHITSKI, A., SONEGO, L., BEN ARIE, R., 2000b. Delayed storage and controlled atmosphere storage of nectarines: two strategies to prevent woolliness. **Postharvest Biol. Technol.** 18, 133–141.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como era esperado, o controle da lanosidade foi eficiente nos tratamentos onde obtiveram-se aumento da atividade da endo e exo-PG e/ou redução da PME. No artigo I foi demonstrado que a atmosfera controlada (AC) promoveu o melhor resultado no controle da lanosidade, enquanto que tratamentos com inibidores da ação do etileno (1-MCP), aquecimento intermitente e presença de etileno durante o armazenamento mostraram pouca viabilidade quando comparados à AC. A AC apresenta-se como uma boa alternativa no controle da formação da lanosidade porém o reduzido tempo de armazenamento dos pêssegos e a sazonalidade com outras espécies para entreposagem, tornam-se os custos onerosos para o produtor. Diante dessa problemática buscou-se um tratamento que pudesse ser conciliado com a atmosfera refrigerada (AR), comumente utilizada pelos produtores.

No artigo II, a aplicação de ácido giberélico na fase de endurecimento do caroço (AG3-1) mostrou-se eficiente no controle da formação da lanosidade, embora não tenha prolongado o ciclo de maturação, o que era esperado no início do trabalho. Os pêssegos da cultivar “Chiripá” não mostraram diferenças significativas em atributos de qualidade como acidez total titulável, sólidos solúveis totais, coloração e época de colheita diferindo-se somente quanto ao perímetro e massa dos frutos, ou seja, o tratamento com AG₃ aumentou o tamanho dos frutos. No que concerne a atividade enzimática, a aplicação de AG₃ na fase de endurecimento do caroço foi capaz de induzir as duas enzimas estudadas (PG's e PME's) simultaneamente. Do ponto de vista tecnológico, esse tratamento apresenta-se como uma boa alternativa para a prevenção da lanosidade.

Diante desses resultados, procurou-se no artigo III estudar a expressão das proteínas correspondentes às PG, PE e Exp na formação e desenvolvimento da lanosidade com a ajuda de anticorpos direcionados contra essas proteínas. Os resultados mostraram que anticorpos anti-PG e anti-PME foram eficientes na detecção dessas proteínas em pêssegos (exceto Exp) e que o controle da lanosidade pode estar

ligado ao equilíbrio entre PG's e PE's demonstrados mediante a imunodeteção com os anticorpos específicos. Com a obtenção dos anticorpos pôde-se monitorar a relação causa efeito (AG₃ x Lanosidade) e os mecanismos (atividade enzimática e deteção das proteínas). Nesta etapa não foi possível concluir-se a expressão de mRNAs das respectivas enzimas, tendo em vista a não reprodutibilidade dos resultados.

Referências Bibliográficas Gerais

ANDREGUETTO, R. & KOSOSKI, A. R. (2005) Situação da produção integrada de frutas no Brasil. (http://www.cpatia.embrapa.br/sbpif6/arquivos_palestras/Palestra_Rozalvo_Andreguetto.doc. acessado em janeiro de 2007).

ARTES, A. CANO AND J.P. FERNANDEZ-TRUJILLO. Pectolytic enzyme activity during intermittent warming storage of peaches. **J. Food Sci.** 61 (1996) (311–313), p. 321. 1996

BEN ARIE, R., SONEGO, L. Pectolytic enzyme activity involved in woolly breakdown of stored peaches. **Phytochemistry** 19, 2553–2555, 1980.

BUESCHER, R.W., FURMANSKI, R.J. Role of pectinesterase and polygalacturonase in the formation of woolliness in peaches. **J. Food Sci.** 43, 264–266, 1978 .

CHITARRA, A.; CHITARRA, M. I. **Fisiologia e pós-colheita de frutos**. Ed. Lavras, 2005.

CRISOSTO, C.H., MITCHELL, F.G., JOHNSON, R.S. Factors in fresh market stone fruit quality. **Postharvest News Inform.** 5, 17N–21N, 1995.

CRISOSTO, C.H., MITCHELL, F.G., JU, Z. Susceptibility to chilling injury of peach, nectarine, and plum cultivars grown in California. **HortScience** 34, 1116–1118, 1999.

DAWSON, D.M., MELTON, L.D., WATKINS, C.B. Cellwall changes in nectarines (*Prunus persica*). Solubilization and depolymerization of pectic and neutral polymers during ripening and in mealy fruit. **Plant Physiol.** 100, 1203–1210, 1992 .

FERNANDEZ-TRUJILLO, A. CANO AND F. ARTES. Physiological changes in peaches related to chilling injury and ripening, *Postharvest Biol. Technol.* 13, pp. 109–119. 1998

- GIOVANNONI, J.J. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell*, 16, S170–S180, 2004.
- GIRARDI, A. CORRENT, L. LUCCHETTA, M. ZANUZO, L. NORA, J. SILVA, C. ROMBALDI. Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripá) during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 38, pp. 25-33 2005.
- JU, Z., DUAN, Y., JU, Z. Leatheriness and mealiness of peaches in relation to fruit maturity and storage temperature. *J. Hort. Sci. Biotech.* 75, 86–91, 2000.
- LUCHSINGER, L.E.; WALSH, C.S.; SMITH, M. Chilling injury of peach fruits during storage. *Horticulturae Science*, Wellesbourne, v.25, n.5, p.31-36, 1996.
- LURIE, S., LEVIN, A., GREVE, L.C., LABAVITCH, J.M. Pectic polymer changes in nectarines during normal and abnormal ripening. *Phytochemistry* 36, 11–17, 1994.
- LURIE, S., ZHOU, H.W., LERS, A., SONEGO, L., ALEXANDROV, S., SHOMER, I. Study of pectin esterase and changes in pectin methylation during normal and abnormal peach ripening. *Physiol. Plant* 119, 287–294, 2003.
- LUZA, J.G., VAN GORSEL, R., POLITO, V.S., KADER, A.A. Chilling injury in peaches: a cytochemical and ultrastructural cell wall study. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 117, 114–118, 1992.
- MITCHELL, F.G.; CRISOSTO, C.H. The use cooling and cold storage to stabilize and preserve fresh stone fruits. In: **VENBRELL, M.; AUDERGON, J.M.** Post-harvest quality and derived products in stone-fruits. Leida : IRTA, 1995. p.125-137.
- NAVA G. AND A. BRACKMANN, The storing of peaches cv. Chiripá, in controlled atmosphere, *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24, pp. 328–332, 2002.
- OBENLAND AND T.R. CARROLL. Mealiness and pectolytic activity in peaches and nectarines in response to heat treatment and cold storage, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 125, pp. 723–728, .2000.

OBENLAND, C.H. CRISOSTO AND J.K.C. Rose, Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches, **Postharvest Biol. Technol.** 29 , pp. 11–18, 2003.

RETAMALES, J., COOPER, T., STREIF, J., KAMA, J.C. Preventing cold storage disorders in nectarines. **J. Hort. Sci.** 67, 619– 626, 1992.

Rombaldi, J.A. Silva, L.B. Machado, A. Parussoto, L.C. Kaster, C.L. Girardi and R. Danieli. Harvesting stage and cold storage influences on the quality of Chiripá peaches (*Prunus persica* L), **Ciência Rural**, pp. 19–25. 2001

Rombaldi, J.A. Silva, A.L. Machado, A. Parussolo, L. Lucchetta, M.R. Zanuzzo, C.L. Girardi and R.F. Cantillano, Storage of Chiripá peach in controlled atmosphere, *Ciência Rural*, 31, pp. 43–47. 2002.

STREIF, J., RETAMALES, J., COOPER, T., KANIA, J.C. Storage of nectarines in CA and high CO₂ concentrations to reduce physiological disorders. **Gartenbauwissenschaft** 57, 166– 172, 1992.

TONUTTI, P.; BONGHI, C.; VIDRICH, R., *et al.*. Molecular and biochemical effects of anoxia, hypoxia and CO₂-enriched atmosphere on Springcrest peaches. **Acta Horticulturae**, Waningen, v.2, n.465, p.439-446, 1998.

VINCKEN, J.P., SCHOLS, H.A., OOMEN, R.J.F.J., MCCALL, M.C., ULVSKOV, P., VORAGEN, A.G.J., VISSER, R.G.F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiol.** 132, 1781–1789, 2003.

VON MOLLENDORFF, L.J., DE VILLIERS, O.T. Role of pectolytic enzymes in the development of wooliness in peaches. **J. Hort. Sci.** 63, 53–58, 1988 .

VON MOLLENDORFF, L.J., DE VILLIERS, O.T., JACOBS, G. Effect of time of examination and ripening temperature on the degree of wooliness in nectarines. **J. Hort. Sci.** 64, 443–447, 1989.

VON MOLLENDORFF, L.J., DE VILLIERS, O.T., JACOBS, G., WESTRAAD, I. Molecular characteristics of pectic constituents in relation to firmness, extractable juice and wooliness in nectarines. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 118, 77–80, 1993.

ZHOU, R. BEN-ARIE AND S. LURIE. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions, **Phytochemistry** 55, pp. 191–195. 2000a

ZHOU, S. LURIE, A. LERS, A. KHATCHITSKI, L. SONEGO AND R. BEN ARIE. Delayed storage and controlled atmosphere storage of nectarines: two strategies to prevent woolliness, **Postharvest Biol. Technol.** 18, pp. 133–141, 2000b.

ZHOU, H.W., LURIE, S., LERS, A., KHATCHITSKI, A., SONEGO, L., BEN ARIE, R. Delayed storage and controlled atmosphere storage of nectarines: two strategies to prevent woolliness. **Postharvest Biol. Technol.** 18, 133–141, 2000c .

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)