

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel'

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

**A relação entre 1-metilciclopropeno e o progresso da podridão “olho-de-boi”
(*Neofabraea brasiliensis*) em maçãs ‘MaxiGala’**

Ísis Gonçalves Toralles

Pelotas, 2019

Ísis Gonçalves Toralles

**A relação entre 1-metilciclopropeno e o progresso da podridão “olho-de-boi”
(*Neofabraea brasiliensis*) em maçãs ‘MaxiGala’**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia ‘Eliseu Maciel’ da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comitê de orientação: César Girardi, Cesar Valmor Rombaldi, Fábio Clasen Chaves

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T676r Toralles, Ísis Gonçalves

A relação entre 1-metilciclopropeno e o progresso da podridão "olho-de-boi" (*neofabraea brasiliensis*) em maçãs 'maxigala' / Ísis Gonçalves Toralles ; Fábio Chaves, orientador ; Cesar Rombaldi, César Girardi, coorientadores. — Pelotas, 2019.

97 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Maçãs 'maxigala'. 2. 1-mcp. 3. Podridão "olho-de-boi". 4. Atmosfera controlada. 5. Expressão gênica. I. Chaves, Fábio, orient. II. Rombaldi, Cesar, coorient. III. Girardi, César, coorient. IV. Título.

CDD : 634.11

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas e a Embrapa Uva e Vinho/Bento Gonçalves pela possibilidade da execução deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao comitê de orientação, **Dr. César Girardi, Dr. Cesar Rombaldi, Dr. Fábio Chaves** pelas contribuições valiosas para construção da tese.

A **Dr^a. Rosa Valdebenito Sanhueza** pelas contribuições na execução do trabalho experimental.

A **Dr^a. Camila Pegoraro e a Dr^a. Vívian Viana** pelos ensinamentos e por toda a ajuda ímpar que garantiram a finalização desse trabalho.

Aos funcionários da empresa **RASIP Agro Pastoral S/A**, em especial ao **Jean Pereira**, por toda a ajuda concedida durante o armazenamento das maçãs.

A todos funcionários da Embrapa Uva e Vinho, em especial ao **Wanderson Ferreira, Renata Gava** e ao **Vasco Rizzon**, pela ajuda prestada e pelos momentos de descontração.

As minhas queridas ex-colegas de trabalho na Embrapa, **Isa, Tati, Naci, Giseli, Juliele, Camilinha, Giovana e Jade**, pelos ensinamentos, amizade e milhares momentos de descontração que garantiram um dia-a-dia de trabalho divertido e leve.

Aos novos amigos que fiz durante a minha estadia na pousada da Embrapa que me oportunizaram ensinamentos valiosos sobre a vida, **Cléber, Simoninha, Cathi, Juju, Tina, Tainá e Marcelo**.

A minha querida amiga de longa data **Vivi** por estar sempre disponível para me ouvir, e por realmente entender o que significa a aventura tese.

Ao **Samuca** por ser um namorado incrivelmente compreensível e paciente durante todos os momentos em que me peguei insegura e ansiosa. Por todo companheirismo, risadas, carinho e amor incondicional.

Por fim, a minha amada família: pai **Ricardo**, mãe **Fernanda**, mana **Ândrea**, cunhado **Fabrício**, vô **Toralles** e ao meu afilhado **Pedro**. Sem o amor de vocês não teria chegado até aqui. Obrigada por sempre terem acreditado no meu potencial.

Resumo

TORALLES, Ísis Gonçalves. **A relação entre 1-metilciclopropeno e o progresso da podridão “olho-de-boi” (*Neofabraea brasiliensis*) em maçãs ‘MaxiGala’.** Comitê de orientação: César Girardi, Cesar Valmor Rombaldi, Fábio Clasen Chaves. 2019. 97 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Com o uso de tecnologias de refrigeração, atmosfera controlada (AC) e uso do 1-metilciclopropeno (1-MCP), estendeu-se o período de conservação de maçãs, por cerca de 12 meses. Mesmo assim, ainda são limitantes a ocorrência de distúrbios patogênicos na pós-colheita. Nesse caso, tem sido cada vez mais frequente a incidência da podridão “olho-de-boi” (*Neofabraea* spp.). Dados gerados pela cadeia produtiva da maçã apontam para perdas de 6 a 8% dos frutos durante a pós-colheita, devido a essa doença. Afora isso, há a percepção empírica de que a incidência de podridões seja maior em frutos tratados com 1-MCP. Buscando compreender se o 1-MCP é um fator facilitador de ocorrência da podridão “olho-de-boi”, estudaram-se maçãs ‘MaxiGala’, com e sem 1-MCP, durante duas safras (2017 e 2018), em dois pontos de colheita por safra, inoculadas ou não com o fungo *N. brasiliensis*. Além disso, investigaram-se duas situações: aplicar o 1-MCP nas maçãs previamente e posteriormente à inoculação. Avaliou-se, após 90 dias sob AC, diâmetro da lesão, percentual de frutos podres, amolecimento de polpa, teor de sólidos solúveis, acidez titulável, e o acúmulo de transcritos dos genes *MdACO*, *MdPG*, *MdPGIP*, *MdPPO*, *MdPAL* e *Mdthau*. Observou-se que maçãs tratadas com 1-MCP antes da inoculação tiveram menores diâmetro de lesão, quando comparada às maçãs com tratadas 1-MCP depois da adição do fungo. Por outro lado, essas apresentaram menores % de frutos podres, quando comparada às maçãs tratadas antes da inoculação. O 1-MCP teve efeito isolado apenas sobre o diâmetro da lesão, em que maçãs tratadas com 1-MCP depois da inoculação com o fungo apresentaram, em média, 1 mm de diâmetro de lesão a mais do que maçãs sem 1-MCP. Sobre o percentual de frutos podres, foram fatores intrínsecos (safra e ponto de colheita) os efeitos mais proeminentes, e não o 1-MCP. Safra 2017 e 1ª colheita contribuíram para os menores % de maçãs podres (< 44%). As maçãs com maior amolecimento de polpa foram as que tiveram um maior acúmulo de transcritos de *MdACO*, *MdPG*, *MdPGIP*. O maior acúmulo de transcritos de *MdPPO* e *MdPAL* teve correlação significativa com a podridão “olho-de-boi”, enquanto *Mdthau* não. Para esse último gene, provavelmente, algum efector desencadeado previamente ao armazenamento foi responsável pelo maior acúmulo de transcritos. De modo geral, os resultados indicaram que as respostas globais foram devidas as variáveis intrínsecas, e não pelo 1-MCP. Com os resultados obtidos fica evidenciado de que não se pode atribuir ao 1-MCP a maior suscetibilidade de maçãs à infecção de *N. brasiliensis*. Além disso, como os fatores safra e ponto de colheita foram os mais relevantes, isso indica que, para se chegar numa conclusão tecnológica mais robusta, os experimentos devem ser conduzidos para mais safras.

Palavras-chave: Maçãs ‘MaxiGala’. 1-MCP. Podridão “olho-de-boi”. Atmosfera controlada. Expressão gênica.

Abstract

TORALLES, Ísis Gonçalves. **The relation between 1-methylcyclopropene and the progress of the bull's eye rot (*Neofabraea brasiliensis*) on 'MaxiGala' apples.** Comitê de orientação: César Girardi, Cesar Valmor Rombaldi, Fábio Clasen Chaves. 2019. 97 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

With the use of refrigeration technologies, controlled atmosphere (CA) and the use of 1-methylcyclopropene (1-MCP), the period of conservation of apples was extended, for about 12 months. Even so, the occurrence of post-harvest pathogenic disorders is still limiting. In this case, it has been increasingly frequent the incidence of bull's eye rot (*Neofabraea* spp.). Data generated by the productive chain of the apple point to losses of 6 to 8% of the fruits during the post-harvest, due to this disease. In addition, there is an empirical perception that the incidence of rot is higher in fruits treated with 1-MCP treatment. In order to understand if 1-MCP is a facilitating factor for the occurrence of bull's-eye rot, 'MaxiGala' apples were studied, with and without 1-MCP, in two harvest per crop, and inoculated or not with the fungus *N. brasiliensis*. Besides, two situations were investigated: 1-MCP was applied to apples before and after inoculation. It was evaluated, after 90 days under CA, lesion diameter, percentage of rotten fruits, pulp softening, soluble solids content, titratable acidity, and the accumulation of transcripts of the genes *MdACO*, *MdPG*, *MdPGIP*, *MdPPO*, *MdPAL* e *Mdthau*. It was observed that apples treated with 1-MCP prior to inoculation had lower lesion diameter when compared to apples with 1-MCP after addition of the fungus. On the other hand, these presented lower % of rotten fruit, when compared to apples treated before inoculation. 1-MCP had an isolate effect only on the diameter of the lesion, in which apples treated with 1-MCP after inoculation with the fungus showed, on average, 1 mm of lesion diameter higher than apples without 1-MCP treatment. On the percentage of rotten, intrinsic factors (harvest and harvesting point) were the most prominent effects, not 1-MCP. Harvest 2017 and 1st harvest contributed to the lowest % of rotten (<44%). The apples with higher pulp softening were those that had a greater accumulation of transcripts of *MdACO*, *MdPG*, *MdPGIP*. The highest accumulation of *MdPPO* and *MdPAL* transcripts had a significant correlation with the bull's-eye rot while *Mdthau* not. For this last transcript, probably an effector triggered prior to storage was responsible for an higher transcript accumulations. Overall, the results indicated that the global responses were due to intrinsic variables, not 1-MCP. With the results obtained it is evidenced that 1-MCP cannot be attributed to the higher susceptibility of apples to infection of *N. brasiliensis*. In addition, because the factors harvest and harvest point were the most relevant, this indicates that, in order to arrive at a more robust technological conclusion, the experiments should be conducted for more harvests.

Keywords: 'MaxiGala' apples. 1-MCP. Bull's eye rot. Control atmosphere. Gene expression.

Lista de Figuras

Figura 1	Lesões ocasionadas pela podridão “olho-de-boi” em várias maçãs. Foto: Rosa Valdebenedito Sanhueza, disponível em: http://rbf.org.br/rs-vacaria-vai-sediar-1o-workshop-sobre-podridao-olho-de-boi-das-macas-destaca-embrapa/	22
Figura 2	Ponto ideal de colheita e alterações das características responsáveis pela qualidade da maçã ao longo do desenvolvimento do fruto. Fonte: Adaptado de Girardi, 2004.....	24
Figura 3	Produção de frutos frescos (excluindo-se frutos congelados e conservados provisoriamente) em 2016 no mundo, adaptado de uma pesquisa feita pela empresa Rabobank em 2018. Fonte: https://research.rabobank.com/far/em/sectors/regional-food-agri/world_fruit_map_2018.html	28
Figura 4	Percentual de maçãs refrigeradas armazenadas em atmosfera controlada ou refrigerada, realizado pelos principais estados produtores (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina). Adaptado de um levantamento publicado, em 2018, no site TodaFruta. Fonte: https://www.todafruta.com.br/artigo-exclusivo-estado-atual-da-cultura-da-macieira/	29
Figura 5	Efeito do 1-MCP sobre distúrbios patogênicos em diversas culturas (Watkins, 2008b).....	34
Figura 6	Mecanismos propostos para interação de taninos com proteínas por pontes de hidrogênio entre taninos e proteína (A) e ligação covalente (B), adaptado de Taiz e Zeiger, 2017.....	37
Figura 7	Ilustração com a cronologia dos eventos envolvidos entre a colheita e fim do período de armazenamento, independente da safra.....	43
Figura 8	Esquema do que foi analisado por expressão gênica para investigar o efeito do tratamento com 1-MCP, quanto a suscetibilidade de maçãs armazenadas sob refrigeração e atmosfera controlada à podridão “olho-de-boi”.....	50

Figura 9	Maçãs 'MaxiGala' feridas e inoculadas com água estéril na ausência (A, C, E, G) e na presença de 1-MCP (B, D, F, H), após 90 dias de armazenamento sob refrigeração e atmosfera controlada.....	57
Figura 10	Gráfico de pareto com os valores do efeito individual e interativo (safra, ponto de colheita e presença do 1-MCP) sobre o percentual de frutos podres (A) e diâmetro da lesão (B). Linha pontilhada (--) representa o valor crítico ($p = 0,05$).....	65
Figura 11	Gráfico 3D que relaciona o perfil de percentual de frutos podres, safra e ponto de colheita. Região verde representa menor percentual de frutos podres e região vermelha representa maior percentual de frutos podres.....	66
Figura 12	Gráfico 3D que relaciona o perfil de diâmetro de lesão, safra e ponto de colheita. Região verde representa menor diâmetro de lesão e região vermelha representa maior diâmetro de lesão.....	67
Figura 13	Gráfico de pareto com os valores do efeito individual e interativo (safra, ponto de colheita, presença do 1-MCP e presença do fungo) sobre o amolecimento de polpa (A) e sobre a relação entre sólidos solúveis totais e acidez titulável, <i>ratio</i> (B). Linha pontilhada (--) representa o valor crítico ($p = 0,05$).....	68
Figura 14	Valor médio do amolecimento de polpa das maçãs 'MaxiGala' nas safras 2017 e 2018.....	69
Figura 15	Perfil de acúmulo dos transcritos envolvidos em resposta as safras (2017 e 2018), ponto de colheita (1ª e 2ª), presença do 1-MCP, do fungo e ferida para maçãs refrigeradas sob atmosfera controlada por 10 dias (A e B) e por 90 dias (C e D), representados por escala que varia de - 2 a 2. A extremidade da escala representada pela cor verde clara indica menor acúmulo de transcritos do gene e a extremidade representada pela cor vermelha clara indica maior acúmulo de transcritos do gene.....	73

- Figura 16 Perfil de acúmulo dos transcritos e de amolecimento de polpa, envolvidos em resposta à safra (2017 e 2018), ponto de colheita (1ª e 2ª), presença do 1-MCP, presença do fungo em maçãs refrigeradas sob atmosfera controlada por 10 ou 90 dias, representados por escalas que variaram de – 2 a 2 (acúmulo de transcritos) e de 4 a 30 (amolecimento de polpa). A extremidade da escala representada pela cor verde clara indica menor acúmulo de transcritos do gene ou menor amolecimento de polpa, e a extremidade representada pela cor vermelha clara indica o oposto..... 77
- Figura 17 Perfil de acúmulo dos transcritos, percentual de frutos podres (%) e diâmetro da lesão (mm) envolvidos em resposta à safra (2017 e 2018), ponto de colheita (1ª e 2ª), presença do 1-MCP, fungo e ferida em maçãs refrigeradas sob atmosfera controlada por 10 ou 90 dias, representados por escalas que variam de – 2 a 2 (acúmulo dos transcritos), de 30 a 100 (percentual de frutos podres) e de 4 a 10 (diâmetro da lesão). A extremidade da escala representada pela cor verde clara indica menor acúmulo de transcritos do gene, ou menor % de frutos podres e diâmetro da lesão, e a extremidade representada pela cor vermelha clara indica o oposto..... 79

Lista de Tabelas

Tabela 1	Delineamento experimental para a avaliação do efeito do 1-MCP sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento da podridão ‘olho-de-boi’ em maçãs ‘MaxiGala’ armazenadas sob refrigeração e atmosfera controlada.....	43
Tabela 2	<i>Primers</i> utilizados para análise em RT-qPCR.....	51
Tabela 3	Eficiência dos genes utilizados a partir da validação por RT-qPCR.....	52
Tabela 4	Qualidade das maçãs ‘MaxiGala’ colhidas em 2017 e 2018 em relação às variáveis firmeza de polpa (FP), sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), relação entre SST/AT (<i>ratio</i>) e índice de iodo-amido (iodo-amido).....	55
Tabela 5	Incidência da podridão “olho-de-boi” em maçãs ‘MaxiGala’ colhidas em dois momentos (1 ^a e 2 ^a colheita), tratadas ou não com 1-MCP (tratamento realizado antes da inoculação com o fungo) e armazenadas em atmosfera controlada (0,5 °C, 90-95% umidade relativa e 0,6% de O ₂ e 1,0% de CO ₂) durante 90 dias.....	59
Tabela 6	Incidência da podridão “olho-de-boi” em maçãs ‘MaxiGala’ colhidas em dois momentos (1 ^a e 2 ^a colheita), tratadas ou não com 1-MCP (tratamento realizado depois da inoculação com o fungo) e armazenadas em atmosfera controlada (0,5 °C, 90-95% umidade relativa e 0,6% de O ₂ e 1,0% de CO ₂) durante 90 dias.....	60
Tabela 7	Incidência da podridão “olho-de-boi” em maçãs ‘MaxiGala’ colhidas em dois momentos (1 ^a e 2 ^a colheita), tratadas com 1-MCP (antes e depois da inoculação com o fungo) e armazenadas em atmosfera controlada (0,5 °C, 90-95% umidade relativa e 0,6% de O ₂ e 1,0% de CO ₂) durante 90 dias.....	61

Tabela 8	Matriz do planejamento experimental com os valores codificados e variáveis independentes (safra, ponto de colheita e presença do 1-MCP) e variáveis dependentes (% de frutos podres e diâmetro da lesão).....	62
Tabela 9	ANOVA dos tratamentos (safra, ponto de colheita e presença do 1-MCP) sobre as variáveis dependentes percentual de frutos podres (Ya) e diâmetro da lesão (Yb).....	63
Tabela 10	Correlação de Pearson dentre e entre as variáveis independentes (safra, ponto de colheita, presença do 1-MCP e presença do fungo) e variáveis dependentes (percentual de frutos podres, diâmetro da lesão, amolecimento de polpa e relação entre sólidos solúveis totais (SST)/acidez titulável (AT), <i>ratio</i>	71

Lista de Abreviaturas e Siglas

1-MCP	1-metilciclopropeno
μL	Microlitros
°Brix	Graus brix
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AC	Atmosfera controlada
ACO	ACC oxidase
ACS	ACC sintase
AD	Atmosfera dinâmica
AM	Ácido málico
ANA	ácido α -naftaleno acético
ANOVA	Análise de variância
AOA	Ácido aminoóxiacético
AR	Armazenamento refrigerado
AT	Acidez titulável
atm	Atmosfera
AVG	aminoetoxivinilglicina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CAT	Catalase
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
DACP	Diazociclopentadieno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	<i>Kit</i> de nucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativa de oxigênio
ET	Etileno
F	<i>Forward</i>
FP	Firmeza de polpa
g	Gramas
h	Horas
KMBA	α-ceto-γ-ácido metilbutírico

<i>MdACO1</i>	Gene que codifica a enzima ACC oxidase 1 em maçã
<i>Mders1</i>	Gene que codifica um receptor de etileno em maçã
<i>Mdetr1</i>	Gene que codifica um receptor de etileno em maçã
<i>MdH1</i>	Gene que codifica a proteína histona 1 em maçã
<i>MdPAL</i>	Gene que codifica a enzima fenilalanina amônia liase em maçã
<i>MdPDI</i>	Gene que codifica a enzima disufito isomerase em maçã
<i>MdPG</i>	Gene que codifica a enzima poligalacturonase em maçã
<i>MdPGIP</i>	Gene que codifica a proteína inibidora de poligalacturonase em maçã
<i>MdPPO</i>	Gene que codifica a enzima polifenoloxidase em maçã
<i>Mdthau</i>	Gene que codifica a proteína <i>thaumatin-like</i> em maçã
<i>MdUBC</i>	Gene que codifica a proteína ubiquitina em maçã
meq	Miliequivalente
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
N	Newton
NBD	2,5-norbomadieno
Nm	Nanômetros
OGs	Oligogalacturonídeos
Oligo(dT)	Oligonucleotídeo deoxitimina
PAL	Fenilalanina amônia liase
PC	Parede celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGs	Poligalacturonases
PGIPs	Proteínas inibidoras da poligalacturonase
PMEs	Pectina metil esterases
POD	Peroxidase
<i>Ppers1</i>	Gene que codifica um receptor de etileno em pêssigo
<i>Ppetr1</i>	Gene que codifica um receptor de etileno em pêssigo
ppm	Partes por milhão
PPO	Polifenoloxidase
PR	Relacionados à patogênese (do inglês <i>pathogenesis-related</i>)

RT-qPCR	RT-PCR quantitativo, do inglês <i>Real-time quantitative reverse transcription-PCR</i>
QR	Quantificação relativa
R	Reverse
R ²	Coefficiente angular da reta
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
s	Segundos
SAM	S-adenosil metionina
SOD	Superóxido desmutase
SST	Teor de sólidos solúveis
UE	União Europeia
UR	Umidade relativa

Sumário

1. Introdução.....	16
2. Revisão bibliográfica	
2.1 A podridão “olho-de-boi” na macieira.....	20
2.2 Ciclo de crescimento e desenvolvimento das maçãs.....	23
2.2.1 Etileno (ET).....	25
2.3 Maçã e tecnologias de conservação.....	27
2.3.1 1-MCP e o efeito sobre a biossíntese do etileno e suas consequências.....	31
2.3.2 1-MCP e os distúrbios fisiológicos e patogênicos.....	34
3 Hipótese.....	41
4. Objetivo Geral.....	41
4.1 Objetivos específicos.....	41
5. Materiais e métodos	
5.1 Maçãs.....	42
5.2 Delineamento experimental.....	42
5.3 Tratamento com 1-MCP.....	44
5.4 Inoculação.....	45
5.5 Análises.....	45
5.5.1 Características físico-químicas.....	45
5.5.2 Isolamento de tecido de maçã sadio e infectado com a podridão “olho-de-boi”.....	46
5.5.3 Maçãs inoculadas com água estéril.....	46
5.5.4 Percentual de frutos podres e diâmetro da lesão.....	46
5.5.5 Amolecimento de polpa e <i>ratio</i> (SST/AT).....	47
5.5.6 Análise de acúmulo relativo de transcritos.....	47
5.5.6.1 Material biológico.....	47
5.5.6.2 Extração de RNA total.....	47
5.5.6.3 Síntese de cDNA.....	48
5.5.6.4 Quantificação relativa dos transcritos por RT-qPCR.....	49
5.6 Análise estatística.....	53
6. Resultados e discussão	
6.1 Características das maçãs por ocasião da colheita.....	55

6.2 Maçãs inoculadas com fungo e com água estéril.....	56
6.3 Incidência de podridão em função da aplicação de 1-MCP, antes e depois da inoculação.....	58
6.4 Análise de variância dos tratamentos e comparação múltipla de médias.....	62
6.5 Estudo dos efeitos safra, colheita, presença do 1-MCP e presença do fungo	64
6.6 Correlação das variáveis independentes e dependentes.....	70
6.7 Estudo do perfil de acúmulo relativo de transcritos.....	72
6.8 <i>MdACO1</i> , <i>MdPG</i> e <i>MdPGIP I</i> e sua relação com as variáveis independentes sobre o amolecimento de polpa.....	75
6.9 <i>MdPPO</i> , <i>MdPAL</i> e <i>Mdthau</i> e sua relação com as variáveis independentes sobre a incidência da doença.....	77
7. Considerações finais.....	81
Referências.....	83
Apêndices.....	96

1. Introdução

Dentre os 10 frutos mais produzidos no mundo, a maçã (*Malus x domestica* Borkh) ocupa a terceira posição, sendo China (44 milhões de toneladas), União Europeia (UE, 10 milhões de toneladas) e Estados Unidos (4,7 milhões de toneladas) responsáveis pelas maiores produções (STATISTA 2017/2018). No Brasil, é produzido, em média, 1,1 milhão de toneladas de maçã (KIST et al., 2018), o que mantém o País na 11ª posição do ranking dos países produtores desse fruto (FAOSTAT). As principais cultivares produzidas no Brasil são ‘Gala’ e ‘Fuji’, sendo ‘Gala’ e seus clones (em torno de 350 mil toneladas) as mais produzidas no Rio Grande do Sul (AGAPOMI, 2018).

A maçã está entre os frutos mais consumidos no Brasil, ficando atrás apenas da banana e da laranja. Em média, a comercialização interna de maçãs nas centrais de abastecimento movimentava cerca de R\$ 1,65 bilhão. No mercado externo, a maçã brasileira vem ganhando cada vez mais espaço, por exemplo, entre 2017 e 2018, maçã e suco de maçã brasileira foram consumidos em Bangladesh, Irlanda, Portugal, Reino Unido, França, Estados Unidos, Japão, dentre outros. Em 2017, a quantidade total de frutos exportados pelo Brasil atingiu 55,4 mil toneladas, atingindo US\$ 41,9 milhões, enquanto a exportação do suco de maçã alcançou 17,1 mil toneladas, num total de US\$ 19,2 milhões (KIST et al., 2018).

A pomicultura brasileira é uma das cadeias produtivas da fruticultura com maior *input* tecnológico. No País, essa atividade se consolida há três décadas, fazendo com que o Brasil passasse de País importador para País exportador. Os fatores que alicerçam esse crescimento e desenvolvimento são *i)* clima favorável para propiciar frutos de excelente qualidade sensorial (crocante, suculento, aromático e saboroso na relação açúcar-acidez), *ii)* adoção de manejo adequado que garante segurança e qualidade desse alimento, *iii)* qualidade das instituições de pesquisa que atuam em prol do desenvolvimento tecnológico dessa cultura e, ainda, *iv)* tecnologias de conservação cada vez mais modernas que asseguram, posteriormente à colheita, maçãs com qualidade sensorial por, em média, 10 meses, dependendo da cultivar, ponto de colheita e tipo de armazenamento (GIRARDI; BRACKMANN; PARUSSOLO, 2004; KIST et al., 2017 e 2018).

Atualmente, as tecnologias de conservação pós-colheita aplicadas na maçã pelos principais estados brasileiros produtores correspondem, majoritariamente, da

combinação entre refrigeração e controle da atmosfera gasosa. A associação dessas tecnologias possibilita a redução da produção do fitohormônio etileno (ET) e das trocas gasosas relacionadas à respiração do fruto. Para tanto, é feita uma modificação da concentração dos gases da atmosfera natural em que o fruto permanecerá armazenado, sendo, para isso, aumentada e diminuída a concentração dos gases CO₂ e O₂, respectivamente (GIRARDI, 2004; BRACKMANN et al., 2011; HO et al., 2013). Associada a essas tecnologias, também é utilizado o 1-metilciclopropeno (1-MCP), substância sem toxicidade, que impede a ação do ET com o intuito de atrasar respostas fisiológicas (amadurecimento e senescência) de frutos climatéricos (WATKINS, 2006; WATKINS et al., 2015). Ressalta-se que o 1-MCP, por inibir a ação do ET, também retarda a produção desse fitohormônio, visto que a síntese desse hidrocarboneto é autocatalítica (McMURCHIE et al., 1972; WATKINS, 2006).

Embora o uso do 1-MCP seja uma tecnologia adicional à refrigeração e ao controle da atmosfera na manutenção da qualidade das maçãs (WATKINS, 2006) – há relatos que esse tratamento contribuiu para um maior percentual de frutos podres. O que parece mediar uma maior ou menor incidência é a concentração de 1-MCP utilizada (PORAT et al., 1999; JIANG et al., 2001; MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005; BLANCO-ULATE et al., 2013). Nesse sentido, menores concentrações 1-MCP, ao bloquear alguns e não todos os receptores de ET, permitem que o ET seja sintetizado numa concentração capaz de desencadear sinalizações apropriadas para promover resistência no fruto (BLANCO-ULATE et al., 2013). No entanto, essas observações ainda são empíricas, e as explicações hipotéticas.

A síntese de compostos fenólicos e a atividade de enzimas relacionadas à defesa também foram investigadas na relação papel do 1-MCP e incidência de podridões em frutos. A principal evidência é de que menores concentrações de 1-MCP contribuam com maiores concentrações de compostos fenólicos, maior atividade de enzimas como fenilalanina amônia liase (PAL), catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD), peroxidase (POD), e polifenoloxidase (PPO) e menor incidência de podridões (PORAT et al., 1999; JIANG et al., 2001; MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005). Todavia, isso não deve ser encarado como via de regra, pois exceções em relação ao que foi exposto também foram descritas (LIU et al., 2005; ZHANG et al., 2012).

Um ponto que não foi considerado como variável em nenhum desses trabalhos foi a ordem do tratamento com 1-MCP em relação à ordem de adição do inóculo. Embora se saiba que uma maior ou menor incidência de podridão englobe variáveis que vão além da ordem do tratamento com 1-MCP, parece que dependendo do momento de aplicação tem-se um ou outro comportamento sobre a incidência de podridões. Para exemplificar isso, enquanto um estudo relatou que maçãs 'Golden Delicious' com 1-MCP apresentaram menor incidência de *Penicillium expansum* (SAFTNER; ABBOTT; CONWAY, 2003), outro descreveu o contrário para mesma cultivar e fungo (JANISIEWICZ et al., 2003). No primeiro caso, o 1-MCP foi utilizado antes da adição do fungo, enquanto no segundo caso, o 1-MCP foi aplicado depois da inoculação.

Outro ponto raramente discutido e que deve ser considerado é a contribuição das variáveis intrínsecas, como o caso de safra e estágio de maturação do fruto na colheita, na relação efeito do 1-MCP e incidência de podridões. Nesse caso, foi evidenciado que o papel do 1-MCP sobre a incidência da podridão "olho-de-boi" em maçãs é diferente dependendo da variável (safra e estágio de maturação) que ele interagir (CAMELDI et al., 2016). Em relação ao estágio de maturação, o que foi mais evidenciado até o momento é que frutos tratados com 1-MCP em estádios de maturação mais avançados apresentam a mesma incidência de podridão do que frutos não tratados com o inibidor de ação do ET (SAFTNER; ABBOTT; CONWAY, 2003; DO AMARANTE et al., 2010; CAMELDI et al., 2016).

Até o momento, há poucos estudos (PORAT et al., 1999; JIANG et al., 2001; MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005; BLANCO-ULATE et al., 2013) que explicam a relação do 1-MCP como responsável por uma maior ou menor incidência de uma determinada podridão em frutos. O senso comum é de que o uso do 1-MCP contribui na manutenção da qualidade da maçã armazenada (BLANKENSHIP; DOLE, 2003). Mesmo assim, há ainda muitas perdas vinculadas às podridões durante o armazenamento (PETRIACQ; LÓPEZ; LUNA, 2018). Para se ter uma ideia, a podridão "olho-de-boi" (causada por espécies de *Neofabraea*) é responsável pelo descarte de, em média, 60 mil toneladas de maçãs brasileiras, se somadas as perdas ocorridas durante e após o armazenamento (EMBRAPA, 2018). Isto representa quase 9% do total da capacidade de armazenagem (700 mil toneladas), que é perdido anualmente por causa dessa doença.

Considerando que a maçã é, mundialmente, um alimento de grande valor econômico, e que o tratamento com 1-MCP é uma tecnologia de conservação utilizada nesse fruto, entende-se que é relevante investigar seu efeito sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças como a podridão “olho-de-boi”. Para entender melhor o papel desempenhado pelo 1-MCP sobre a incidência dessa podridão em maçã, investigou-se a ordem de adição do 1-MCP *versus* inóculo, em dois estádios de maturação para duas safras (2017 e 2018).

2. Revisão bibliográfica

2.1 A podridão “olho-de-boi” na macieira

Dentre a gama de fungos que atacam as maçãs, existem muitos que causam podridões. As podridões são estabelecidas como infecções latentes e caracterizadas pelo contato do esporo com as flores e os frutos (SANHUEZA et al., 2006; MONDINO et al., 2009; SANHUEZA, 2015). No caso específico de maçãs, no contexto brasileiro, há dois grupos de patógenos causadores de podridões responsáveis pelos danos ocasionados na pós-colheita: os caracterizados como patógenos de pós-colheita (propriamente ditos), representados pelos fungos *P. expansum* (mofo azul), *B. cinerea* (mofo cinzento) e *Alternaria* spp.; e os chamados de patógenos associados às doenças de verão, que incluem os fungos *Glomerella cingulata* / *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum* (podridão amarga), *Neofabraea* spp. (podridão “olho-de-boi”) e *Botryosphaeria dothidea* (podridão branca) (NUNES e ALVES, 2015; CROUS et al., 2015).

Nesse cenário, uma das podridões que merece especial atenção é a podridão “olho-de-boi” por ser considerada uma doença causada por uma diversidade de espécies e por apresentar sensibilidade variável a tratamentos com fungicidas (PEŠICOVÁ et al., 2017; BOGO et al., 2018). No Brasil, ela é responsável por perdas que variam de 8 a 20% no período final da armazenagem, podendo atingir até 35% dos frutos, se consideradas ainda as perdas durante a comercialização. Nesse sentido, são estimadas perdas anuais de, em média, 60 mil toneladas de maçãs por causa dessa doença (EMBRAPA, 2018). Na tentativa de minimizar esse problema, a indústria costuma destinar os frutos sintomáticos para a elaboração de sucos; no entanto, o valor pago pelo quilo do fruto é menor (ARAÚJO et al., 2016). A podridão “olho-de-boi” também é descrita como uma das principais doenças de pós-colheita em diversos países como na Austrália, Chile, Estados Unidos, Itália, Polônia e República Tcheca (CUNNINGTON, 2004; HENRIQUEZ, 2005; SPOTTS et al., 2009; SOTO-ALVEAR et al., 2013; HORTOVA; NOVOTNY; ERBAN, 2014; CROUS et al., 2015; CAMELDI et al., 2016; PEŠICOVÁ et al., 2016; MICHALECKA et al., 2016; AGUILAR; MAZZOLA; XIAO, 2017).

No Brasil, a podridão “olho-de-boi” foi constatada em 1996 nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, em maçãs ‘Fuji’ e ‘Golden Delicious’. O agente

causal da doença foi identificado como *Neofabraea perennans* (Kienholz), de fase anamórfica *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) (SANHUEZA, 2001; SANHUEZA et al., 2006; BOGO et al., 2018). Contudo, mais recentemente, constatou-se que, na verdade, tratava-se de duas espécies de *Neofabraea* (*N. brasiliensis* Sanhueza & Bogo e *N. actinidia*), sendo essas as de maior prevalência no sul do Brasil (CROUS et al., 2015; BOGO et al., 2018). Além disso, foi comprovado que elas são consideradas filogeneticamente distintas das demais espécies de *Neofabraea* anteriormente descritas na literatura (CROUS et al., 2015).

As maçãs podem ser infectadas no período entre a queda das pétalas e a colheita, enquanto o sintoma costuma aparecer meses depois de terem sido colhidas (geralmente após 3-4 meses de armazenamento). O modo de infecção é iniciado por uma lesão na epiderme, por aberturas naturais, como a calicinal e a peduncular. Apesar do patógeno não necessitar de ferimentos para a infecção ser iniciada, a ocorrência de lesões por granizo, insetos e aquelas ocorridas durante a colheita e armazenamento facilitam a infecção (SANHUEZA et al., 2006; BOGO et al., 2018).

O sintoma é caracterizado, externamente, por uma lesão de cor marrom clara com o centro amarelo-pálido, de forma mais ou menos circular, algumas vezes com margens marrom-escura ou avermelhada e textura firme. Por sua vez, internamente, os tecidos apresentam-se desidratados e com um espaço no centro da lesão e/ou em outra área da podridão. Além disso, as margens entre o tecido sadio e doente são bem definidas. Em lesões maiores que 1 cm de diâmetro, ocorre rachadura na epiderme em virtude da desidratação dos tecidos colonizados pelo patógeno. A doença é designada com “olho-de-boi” pois a lesão se assemelha a um olho de boi (SANHUEZA, 2001; SANHUEZA et al., 2006) (Figura 1).



Figura 1 – Lesões ocasionadas pela podridão “olho-de-boi” em várias maçãs. Foto: Rosa Valdebenedito Sanhueza, disponível em: <http://rbf.org.br/rs-vacaria-vai-sediar-1o-workshop-sobre-podridao-olho-de-boi-das-macas-destaca-embrapa/>

Espécies de *Neofabraea* spp. podem se desenvolver em frutos armazenados a 0 °C, mas não acima de 30 °C, sendo a temperatura ótima de desenvolvimento entre 18–20 °C (HORTOVA; NOVOTNY; ERBAN, 2014; PEŠICOVÁ et al., 2017). Além disso, a pluviosidade durante o ciclo de produção também deve ser considerada, pois chuvas frequentes interferem na proteção química do fruto e contribuem para a dispersão e disseminação dos esporos no pomar (SANHUEZA et al., 2006). O controle da doença com fungicidas é dificultado pela variabilidade das espécies do fungo que apresentam sensibilidade distinta aos fungicidas (PEŠICOVÁ et al., 2017; BOGO et al., 2018).

Dentre as estratégias de controle recomendadas para essa doença pode-se citar a redução da disponibilidade de inóculo, a partir da eliminação de cancrios, visto que nesses se desenvolvem a estrutura do fitopatógeno. Além disso, é importante manter o pomar limpo, isto é, ramos da poda e frutos descartados no raleio devem ser removidos do pomar, por serem uma possível fonte de contaminação (SANHUEZA et al., 2006). Recomenda-se, adicionalmente, *i*) colheita cuidadosa dos frutos, num estágio de maturação adequado para cada cultivar; *ii*) transporte em condições que não possibilite a incidência de sol sobre os frutos e que não propicie danos/ferimentos durante o percurso; e *iii*) que após, colhidos, os frutos sejam resfriados o quanto antes, uma vez que temperaturas superiores à 12 °C, por mais de 8 h, aumentam o avanço da infecção (SANHUEZA, 2015). Há diversas medidas de controle adicionais (controle químico, desinfestação das maçãs previamente ao armazenamento, etc) que, se realizadas conjuntamente às estratégias mencionadas,

asseguram um menor percentual de perdas durante a pós colheita de maçãs (SANHUEZA, 2004; SANHUEZA et al., 2006; SANHUEZA, 2015).

2.2 Ciclo de crescimento e desenvolvimento das maçãs

Basicamente, o ciclo de crescimento e desenvolvimento dos frutos corresponde a três fases: *i*) crescimento; *ii*) maturação; e *iii*) senescência (CHITARRA e CHITARRA, 2005; PAUL; PANDEY; SRIVASTAVA, 2012). O crescimento é marcado como o período em que ocorre o aumento do número de células. Um ponto chave dessa fase é o armazenamento de água, carboidratos e ácidos orgânicos no vacúolo, que serão utilizados em processos bioquímicos durante todo o ciclo vital. Para isto, a respiração é indispensável, pois é ela que gera grande quantidade de energia e disponibiliza carbono para a biossíntese de numerosos compostos orgânicos. De modo geral, quanto menos avançado o estágio de maturação na colheita, maior o potencial de armazenamento, mas menor a qualidade sensorial. No sentido inverso, quanto mais avançado o estágio de maturação na colheita, menor o potencial de armazenamento e maior a qualidade sensorial. Na maturação fisiológica ocorre o aprimoramento do sabor, odor, cor da epiderme, bem como acúmulo de reservas específicas de cada cultura (TAIZ e ZEIGER, 2017). Ao final da maturação fisiológica, os frutos tornam-se menos dependentes do suprimento de água e nutrientes pela planta e são capazes de realizar atividades vitais com suas próprias reservas (CHITARRA e CHITARRA, 2005). É no final dessa fase e antes do pico climatérico (período “pré-climatérico”) o ponto ideal de colheita de maçãs destinadas ao armazenamento, quando a síntese de ET autocatalítico ainda é baixa e a taxa respiratória é mínima (Figura 2) (GIRARDI, 2004). A fase de transição entre a maturação fisiológica e a senescência é descrita como maturação ou amadurecimento comercial. Durante a maturação ou amadurecimento comercial dos frutos, as alterações químicas e físicas estão associadas às alterações de textura, aparência, sabor e aroma resultando em alta qualidade sensorial (GOULAO e OLIVEIRA, 2008). Por último, tem-se a senescência, cuja etapa é caracterizada pela diminuição dos processos anabólicos (de síntese) e aumento dos processos catabólicos (de degradação). Nessa fase também ocorre progressiva perda da integridade das membranas celulares, levando ao envelhecimento e morte celular (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

O ponto mais recomendado para a colheita de maçãs está representado a seguir (Figura 2). Observa-se que esse ponto segue a evolução de diversas características responsáveis pela qualidade da maçã, que ocorrem durante o desenvolvimento do fruto, como a diminuição da acidez e do amido, aumento da síntese de açúcares e cor de cobrimento, por exemplo. No caso específico de maçãs, esse ponto, ou estágio de maturação é caracterizado fisiologicamente como a transição do estágio pré-climatérico para o climatérico.

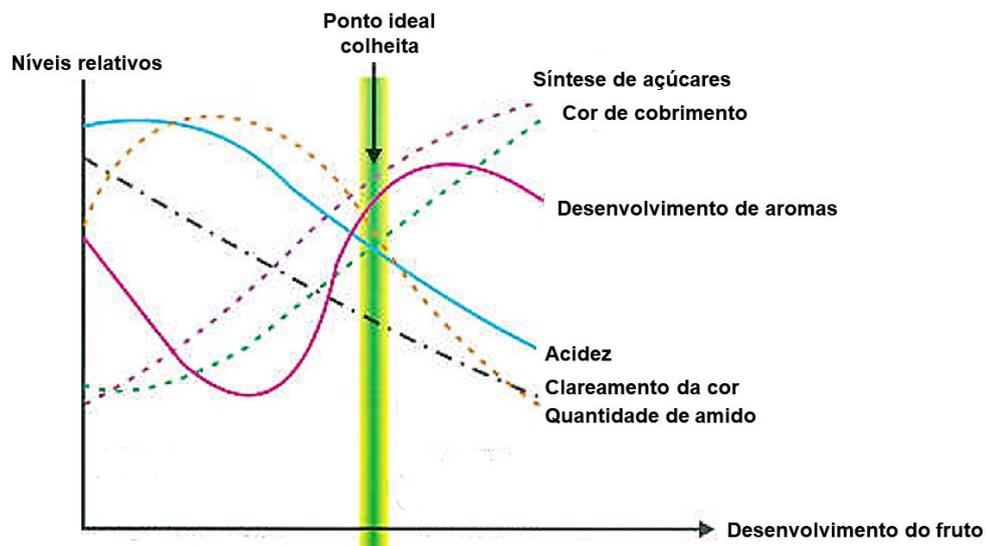


Figura 2 – Ponto ideal de colheita e alterações das características responsáveis pela qualidade da maçã ao longo do desenvolvimento do fruto. Fonte: Adaptado de Girardi, 2004.

É importante atentar para o fato de que a escolha do ponto de colheita define também o tempo de armazenamento. Nesse sentido, têm-se problemas tanto relacionados a antecipação da colheita, como maçãs de menor tamanho, baixo teor de açúcares e teor de compostos aromáticos e suscetibilidade a distúrbios fisiológicos (WATKINS, 2003; STANGER et al., 2013) – quanto relacionados ao retardamento excessivo, como perda de crocância e de suculência, suscetibilidade a distúrbios fisiológicos e a podridões (WATKINS et al., 2005; STANGER et al., 2013).

Na prática, os indicadores investigados para monitorar os atributos que interferem no ponto ideal de colheita são firmeza de polpa (FP), coloração das sementes, índice de degradação do amido, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT) e cor de fundo da epiderme (WATKINS, 2003). Costuma-se optar por esses indicadores devido à simplicidade, rapidez e baixo custo de análise (ARGENTA et al., 2010).

2.2.1 Etileno (ET)

O ET é um hidrocarboneto insaturado gasoso, sendo uma das moléculas orgânicas (C₂H₄) mais simples com atividade biológica produzidas por plantas e frutos. Em plantas e frutos, sua síntese é desencadeada a partir da metionina (precursora), a qual é convertida a SAM (S-adenosil metionina), via ciclo de Yang. A partir disso, SAM é convertida ao ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), pela enzima ACS (ACC sintase). Por fim, ACC é convertido no fitohormônio ET, pela enzima ACO (ACC oxidase) (NACHTIGAL et al., 2002). A enzima ACS é uma enzima citosólica, enquanto a enzima ACO ainda não tem sua localização celular definida. Há trabalhos que sugerem uma localização citoplasmática, outros membranária, e outros apoplástica (CHITARRA e CHITARRA, 2005; KERBAUY, 2008).

A atividade da ACS é o ponto regulatório mais importante na produção de etileno, sendo que os níveis dessa enzima são afetados por mudanças ambientais, hormonais e por diversos eventos fisiológicos (FUJIMOTO et al., 2000; YANG et al., 2013). O aumento na produção de ET verificado em certas fases do desenvolvimento, como amadurecimento e senescência de frutos, ou em resposta a estresses, dentre os quais ferimentos mecânicos, seca, geadas, infecções e agentes tóxicos, é acompanhado por uma elevação na síntese ou na ativação da ACC sintase. A atividade da enzima ACS é dependente de piridoxal 5-fosfato. AVG (aminoetoxivinilglicina) e AOA (ácido aminooxiacético) bloqueiam a conversão de SAM a ACC. A ACO é uma enzima que necessita de ferro e ascorbato para ter atividade, sendo a conversão de ACC em ET inibida por benzoato de sódio, altas temperaturas, pouca oxigenação (co-substrato de ACO), CO₂ (em níveis elevados ele se liga ao receptor no lugar do ET). As enzimas ACS e ACO possuem isoformas derivadas de uma família multigênica, em que cada uma é codificada por um gene diferente. Por exemplo, em tomateiros, há pelo menos nove genes para a ACS, expressos de maneira distinta nos tecidos, dependendo do desenvolvimento das plantas ou em respostas aos fatores ambientais (KERBAUY, 2008).

Como um gás, o ET se difunde facilmente no interior dos tecidos, através dos espaços intercelulares. A água e os solutos do citoplasma dificultam o movimento do fitohormônio. Devido à sua afinidade com lipídios (14 vezes mais solúvel do que na água), ele é capaz de se difundir com facilidade através da casca de alguns frutos,

como a maçã (presença de ceras) (KERBAUY, 2008). Para exercer sua ação, esse fitohormônio se liga a receptores proteicos da membrana do retículo endoplasmático (hidroxiprolina-ETR1), que contém íons como cobre (Cu^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) como sítio de ligação. A ligação entre etileno-receptor, através de um mensageiro secundário, faz com que seja enviado um sinal até o núcleo para o DNA (ácido desoxirribonucleico), sinal conhecido como transdução de sinal. A partir disso, é produzido mRNA (ácido ribonucleico mensageiro), por exemplo, ao degradar a parede celular do fruto são produzidos mRNAs que correspondam a enzimas hidrolíticas (poligalacturonases, PGs, pectinases e celulases). Essa fase é denominada de transcrição gênica. No citosol, ocorre a etapa de tradução dos mRNAs, ou seja, sintetizam-se essas enzimas que são, finalmente, transportadas para organelas, como o complexo de Golgi para, a seguir, serem encaminhadas à parede celular (RODRIGUES; ONO, 2001).

De maneira simplificada, pode-se dizer que há dois sistemas reguladores de biossíntese do ET. O sistema 1 é responsável pela produção basal de ET. Nos frutos climatéricos, esse sistema atua até o início do amadurecimento. Posteriormente, a partir da exposição a baixas concentrações de ET, emanadas pelo sistema 1, ocorre um aumento da sua produção, sendo esse caracterizado como sistema 2. O sistema 2 é responsável pela produção autocatalítica do ET em frutos climatéricos. Nessa fase há uma grande produção de ET nos tecidos, possibilitando que o fruto amadureça e, posteriormente, entre em senescência (McMURCHIE et al., 1972).

Como o objetivo do estudo é compreender o papel do 1-MCP em relação à suscetibilidade ao fungo conhecido como podridão “olho-de-boi” é importante esclarecer que, além das plantas e dos frutos, diversos fungos como *Penicillium digitatum*, *P. cyclopium*, *P. veluúnum*, *Mucor hiemalis*, *Agaricus bisporus*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus clavatus*, *B. cinerea*, entre outros também são capazes de sintetizar esse fitohormônio (CHAGUÉ, 2010). É possível que o ET seja sintetizado em frutos verdes, após o reconhecimento do patógeno no sistema 1 e que a concentração de ET induzida por patógenos e danos mecânico ative especificamente a expressão de genes de defesa e/ou outras vias de resistência. Todavia, uma vez que os níveis de ET celular ultrapassam um limiar pode ser desencadeado uma maior suscetibilidade, independentemente dos mecanismos de defesa ativados, pois é provável que ocorra a indução do sistema 2 (produção auto catalítica do ET, que desencadeiam o amadurecimento do fruto). Portanto, o ET

pode atuar como um promotor da suscetibilidade ou resistência, dependendo de seus níveis no tecido e do estágio de desenvolvimento do fruto (BLANCO-ULATE et al., 2013).

A secreção de ET por fungos ocorre por duas vias bioquímicas, sendo metionina ou oxoglutarato os possíveis aminoácidos precursores (CHAGUÉ, 2010). A síntese de ET, descrita para plantas e frutos, a partir da metionina, foi relatada também para *Dictyoselium mucoroides* (AMAGAI e MAEDA, 1992) e *P. digitatum* (JIA et al., 1999). Contudo, essa primeira via não é tão comumente encontrada como a segunda, a qual desamina a metionina para α -ceto- γ -ácido metilbutírico (KMBA), sendo KMBA, posteriormente, oxidado a ET. Cabe destacar que a conversão de metionina em KMBA envolve uma transaminase, enquanto a oxidação requer radicais hidroxila, produzidos a partir de oxigênio molecular. Essa via foi primeiramente caracterizada em bactérias (PRIMROSE e DILWORTH, 1976), sendo, atualmente, descrita para vários fungos. A via do oxoglutarato é catalisada por ascorbato oxidase, na presença de outros aminoácidos (arginina ou lisina) como cofatores. A escolha do cofator dependerá do tipo de fungo. A enzima ascorbato oxidase catalisa duas reações simultaneamente, uma que produz ET por oxigenação do oxoglutarato, e outra que catalisa a produção de carboxilato de succinato, guanidina e pirrolina (FUKUDA et al., 1992). Essa via foi identificada nos fungos *P. cyclopium* (PAZOUT e PAZOUTOVA, 1989), *F. oxysporum* (HOTTIGER e BOLLER, 1991) e, ainda, em *P. digitatum* (FUKUDA et al., 1986).

2.3 Maçã e tecnologias de conservação

Dentre os 10 frutos frescos mais produzidos no mundo, a maçã ocupa a terceira posição (Figura 3), sendo China (44 milhões de toneladas), União Europeia (UE, 10 milhões de toneladas) e Estados Unidos (4,7 milhões de toneladas) responsáveis pelas maiores produções (STATISTA 2017/2018). Entre 2016 e 2018, o Brasil produziu em média 1,1 milhão de toneladas (KIST et al., 2018), o que o mantém na 11ª posição do ranking dos países produtores (FAOSTAT).

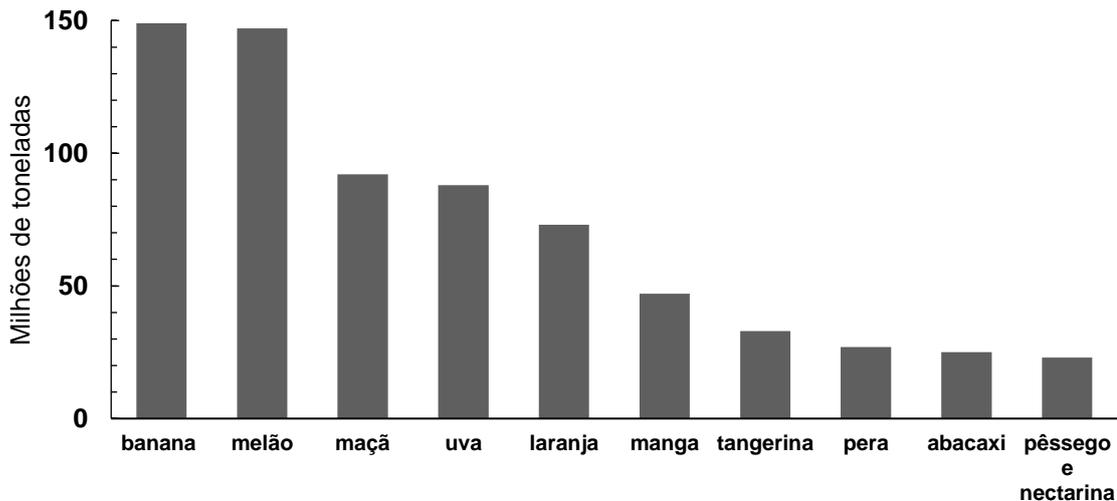


Figura 3 – Produção de frutos frescos (excluindo-se frutos congelados e conservados provisoriamente) em 2016 no mundo, adaptado de uma pesquisa feita pela empresa Rabobank em 2018. Fonte: https://research.rabobank.com/far/en/sectors/regional-food-agri/world_fruit_map_2018.html

Metade da produção nacional de maçã é advinda do Rio Grande do Sul, no qual o município de Vacaria é o maior produtor, sendo a ‘Gala’ e seus clones os mais produzidos (AGAPOMI, 2018). As características do clima temperado brasileiro, que possibilitam longos períodos de frio para que as plantas iniciem um novo ciclo vegetativo, com brotação e floração normais, aliadas às características sensoriais destacadas pelos consumidores, como aroma e sabor atraentes, justificam o porquê dessa cultivar (Gala) e de seus clones virem sendo amplamente produzidos no Rio Grande do Sul e em outros estados brasileiros (Santa Catarina e Paraná) (PETRI, 2006; KIST et al., 2015). O interesse por certos clones costuma ocorrer por alguma característica que os torna mais interessantes que a variedade que lhe deu origem como, por exemplo, cor da casca e tamanho dos frutos. Os clones são oriundos de mutações que, geralmente, surgem espontaneamente e que são selecionados e multiplicados vegetativamente (FIORAVANÇO e SANTOS, 2013).

A maçã permanece disponível para consumo durante todo o ano graças às tecnologias de conservação envolvidas. Atualmente, as tecnologias de conservação aplicadas na maçã pelos principais estados brasileiros produtores correspondem, majoritariamente, da combinação entre refrigeração e controle da atmosfera gasosa (Figura 4).

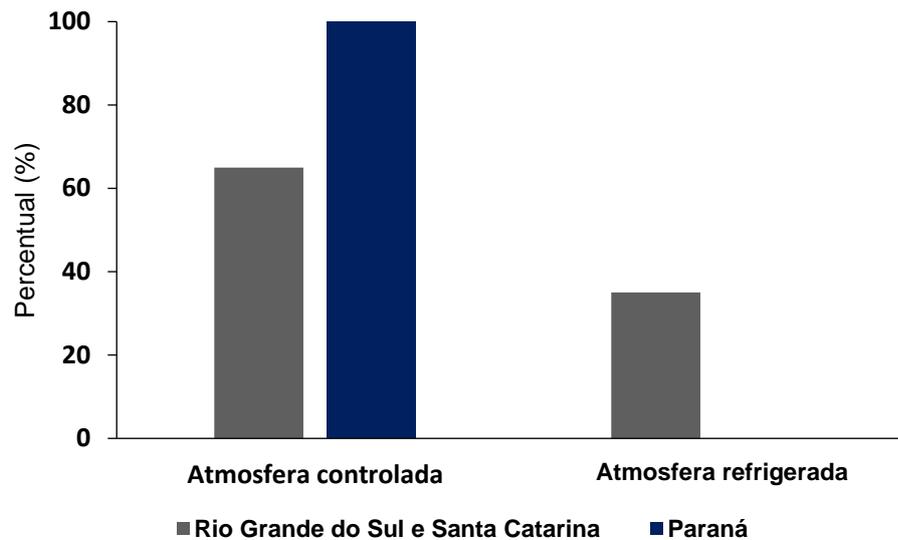


Figura 4 – Percentual de maçãs refrigeradas armazenadas em atmosfera controlada ou refrigerada, realizado pelos principais estados produtores (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina). Adaptado de um levantamento publicado, em 2018, no site TodaFruta. Fonte: <https://www.todafruta.com.br/artigo-exclusivo-estado-atual-da-cultura-da-macieira/>

Dentre os frutos de relevância econômica no Brasil, o setor de maçãs é o que mais emprega tecnologia na pós-colheita. O armazenamento refrigerado (AR), que era utilizado na década de 80 e 90, foi praticamente substituído pelo armazenamento refrigerado em atmosfera controlada (AC), a partir da década de 90 (BRACKMANN, 2007). Com isso se estendeu o período de armazenamento de 3 a 5 meses para, praticamente, 7 a 9 meses (BRACKMANN, 2004). Em paralelo a essa evolução, há o registro para o uso do 1-MCP na maçã, sendo, a partir disso, utilizado até o presente (WATKINS, 2006; WATKINS et al., 2015). Isso se deve aos benefícios gerados pela aplicação dessa tecnologia, como estender o período de armazenamento e a vida de prateleira após AR e AC (MIR e BEAUDRY, 2000; WATKINS, 2008b). Essa extensão do período de oferta se deu, sobretudo, pelo menor amolecimento de polpa e menor ocorrência de farinosidade na polpa, mantendo os frutos suculentos (STORCH et al., 2015).

O AR combinado à AC possibilita a redução da produção do fitohormônio ET e das trocas gasosas relacionadas à respiração do fruto. Para tanto, é feita uma modificação da concentração dos gases da atmosfera em que o fruto permanecerá armazenado, sendo, para isso, aumentada e diminuída a concentração dos gases CO_2 e O_2 , respectivamente (GIRARDI, 2004; BRACKMANN et al., 2011; HO et al., 2013). Quando comparada ao armazenamento refrigerado combinado à atmosfera natural, a AC prolonga o período de conservação das maçãs pois retarda o

amadurecimento, diminui a ocorrência de distúrbios fisiológicos e podridões e reduz a perda de peso e o murchamento (BOTH et al., 2014). Como inconvenientes, pode-se considerar o maior investimento e a limitação da abertura das câmaras para remoção de lotes de frutos, bem como a possibilidade de ocorrência de distúrbios fisiológicos relacionados à baixa concentração de O₂ e/ou alto CO₂ (GIRARDI, 2004; BOTH et al., 2014).

Em associação à refrigeração e ao controle da atmosfera, uma terceira tecnologia de conservação aplicada na maçã foi o tratamento com 1-MCP. Esse composto é comumente utilizado para inibir a ação do ET, com o intuito de atrasar respostas fisiológicas (amadurecimento e senescência) de frutos climatéricos, o que permite seu armazenamento por um período mais prolongado, em média, 10 meses, dependendo da cultivar, ponto de colheita e tipo de armazenamento. Por ser um composto que age inibindo a ação do ET, e por a maçã ser um fruto tipicamente climatérico, ao inibir a ação, também se inibe parcialmente a produção desse fitohormônio (GIRARDI; BRACKMANN; PARUSSOLO, 2004; KIST et al., 2017 e 2018).

Descoberto na década de 90 por Sisler e colaboradores (SISLER; DUPILLE; SEREK, 1996), o 1-MCP passou a ser comercializado somente a partir de 2005 em diversos países, inclusive no Brasil (WATKINS, 2006). Embora muitas culturas (abacate, abacaxi, ameixa, banana, mamão, melão, nectarina, pera, tomate, etc) sejam tratadas com esse produto em diversos países (Argentina, Austrália, Áustria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, China, Costa Rica, Estados Unidos, Israel, França, México, Nova Zelândia, Reino Unido, etc) sua expressiva popularidade com a maçã se deve ao efeito positivo do 1-MCP na manutenção da FP durante o armazenamento e comercialização (HARKER; GUNSON; JAEGER, 2003; GÁLVEZ-LÓPEZ et al., 2012).

Um avanço na tecnologia de aplicação do 1-MCP resultou da sua formulação como um pó estável em que é complexado com γ -ciclodextrina, de modo a ser facilmente liberado como um gás, quando dissolvido em água (WATKINS, 2006). Sob a marca SmartFresh™, o produto comercial do 1-MCP é aplicado no Brasil em concentrações que variam entre 0,003 mg/L a 0,086 mg/L, de acordo com a cultura (AGRAPAR). Este produto não é tóxico aos animais e ao meio ambiente (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002).

A duração da ação do 1-MCP é dependente de alguns fatores como a concentração e o tempo de exposição, a temperatura do ambiente em que é feito o tratamento e o estágio de maturação do fruto. Além disso, o tratamento é influenciado pelo período em que o fruto permanece armazenado sob refrigeração antes do tratamento com 1-MCP (SISLER e BLANKENSHIP, 1996; SISLER e SEREK, 1997; HARRIS et al., 2000; WATKINS; NOCK; WHITAKER, 2000). Zhang e colaboradores (2009) propuseram que os níveis internos de ET influenciam fortemente a eficácia do tratamento com 1-MCP e que, desse modo, poderia explicar a perda de sensibilidade de alguns frutos climatéricos ao 1-MCP, quando aplicado a estádios de maturação mais avançados.

Cabe ressaltar que, além do 1-MCP inibir a ação do ET, íons prata e substâncias como 2,5-norbomadieno (NBD), o diazociclopentadieno (DACP) também apresentam esse efeito inibitório, contudo todos são altamente tóxicos. Enquanto 1-MCP, NBD e DACP exercem seu efeito através da ligação com os receptores – a prata altera a capacidade dos receptores em traduzir o sinal para os componentes seguintes da cadeia de sinalização (KERBAUY, 2008).

Numa 4ª geração tecnológica, tem-se o armazenamento em atmosfera dinâmica (AD), seja ela baseada no princípio das diferenças de fluorescência de clorofila, ou do quociente respiratório. Em ambos os casos, tem-se progresso tecnológico, estendendo o tempo de armazenamento, mantendo-se frutos com qualidade superior à AC e/ou AC + 1-MCP (WATKINS, 2008a).

O panorama atual oferece ao setor a possibilidade de associar ou não princípios e métodos de conservação de maçãs que vão do AR ao AR + 1-MCP, à AC, à AC + 1-MCP, à AD, à AD + 1-MCP (GIRARDI et al., 2015), além da possibilidade de se usar ou não um inibidor da enzima ACS no pomar, como, por exemplo, o AVG (KERBAUY, 2008).

2.3.1 1-MCP e o efeito sobre a biossíntese do etileno e suas consequências

O 1-MCP age na rota metabólica do receptor de ET, impossibilitando o desencadeamento de uma cascata de reações que costumam ocorrer na presença desse fitohormônio (SISLER; DUPILLE; SEREK, 1996). Quando o 1-MCP se liga aos receptores de ET, por exemplo, em tomates (TASSONI; WATKINS; DAVIES, 2006) e maçãs (PANG et al., 2006; DAL CIN et al., 2006; TATSUKI e ENDO, 2006)

foi observado um menor acúmulo de transcrição e uma redução da atividade das enzimas (ACS e ACO) envolvidas na síntese desse fitohormônio (TAIZ e ZEIGER, 2017). Além disso, dependendo da cultura investigada, o 1-MCP desencadeia um perfil de acúmulo de transcritos associados aos receptores de ET diferente do obtido na ausência dele. A exemplo disso, pode-se citar que enquanto em maçãs 'Golden Delicious' o acúmulo de transcritos *Mders1* e *Mdetr1* foi suprimido na presença de 1-MCP, em pêssegos 'Summer Rich' os níveis dos transcritos *Ppetr1* e *Ppers1* não foram afetados por ele. O efeito causado na transcrição desses genes na presença do 1-MCP em maçãs e pêssegos pode estar relacionado a diferenças em termos de razão, de padrões de expressão e/ou *turnover* dos receptores de ET (DAL CIN et al., 2006).

O 1-MCP atrasa o amolecimento de polpa em diversas culturas (abacate, ameixa, damasco, manga, mamão, maçã, dentre outros). Existem estudos que relacionaram o efeito do 1-MCP sobre a manutenção da FP durante a pós-colheita que se encontram detalhados em artigos de revisão (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; WATKINS, 2006). Dentre os principais aspectos, é citado que o 1-MCP atrasa o amolecimento de polpa, porque ao inibir a ação do ET, muitos genes codificadores de enzimas degradantes da parede celular, por serem etileno dependentes, têm sua transcrição reprimida. Contudo, isso não é via de regra, pois em mais de um trabalho foi demonstrado que a perda de FP ocorreu independentemente do fitohormônio ET (BLANKENSHIP; DOLE, 2003). Como exemplo, foi demonstrado que mesmo que a atividade de enzimas PGs tenha sido suprimida em abacates com 1-MCP, o amolecimento de polpa desse fruto ocorreu (JEONG; HUBER; SARGENT, 2002). Nesse sentido, uma das possíveis explicações para isso é que mesmo sendo relatado que diversas enzimas etileno-dependentes estão associadas com a perda de FP, a manutenção da FP é um evento mais complexo, pois, além do envolvimento dessas enzimas, há o envolvimento de enzimas relacionadas à biossíntese de açúcares da parede celular, e outras, além das enzimas mais estudadas PGs e PMEs (pectina metil esterase) (WANG et al., 2018).

Assim como para o amolecimento de polpa, os mesmos trabalhos de revisão (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; WATKINS, 2006) abordam o papel do 1-MCP sobre a acidez titulável (AT) e sobre os sólidos solúveis totais (SST). De uma forma geral, o 1-MCP atrasa ou inibe a perda de AT em diversas culturas, como abacaxi, tomate, ameixas e cenouras (BLANKENSHIP; DOLE, 2003). Em maçãs, o 1-MCP manteve a

AT em 'Red Delicious', 'Granny Smith', 'Fuji' 'Gala', 'Ginger Gold' e 'Jonagold' (FAN e MATTHEIS, 1999). Com relação ao SST, o efeito do 1-MCP variou com a cultura e a cultivar. Por exemplo, há evidências que relatam que abacaxi e mamão tratados com 1-MCP têm maior SST, do que seus respectivos frutos não tratados. Em morangos, por sua vez, o tratamento com 1-MCP contribuiu para menores SST (TIAN et al., 2000), enquanto foi indiferente para outras culturas (ameixa, manga, damasco e pinha) (HOFMAN et al., 2001; DONG; LURIE; ZHOU, 2002). Para a maçã é tanto relatado que os SST são maiores na presença do 1-MCP (FAN e MATTHEIS, 1999), quanto que a presença dele foi indiferente (BLANKENSHIP; DOLE, 2003). Nesse aspecto, cabe comentar que isso varia de acordo com a cultivar: maçãs 'McIntosh' e 'Law Rome' com 1-MCP apresentam menores SST, do que maçãs sem tratamento; maçãs 'Delicious' e 'Empire' com 1-MCP tiveram maiores SST do que aquelas não tratadas. Além disso, a combinação entre 1-MCP e tipo de armazenamento (com ou sem controle de atmosfera) parece desencadear uma outra resposta em relação a esse atributo de qualidade (WATKINS; NOCK; WHITAKER, 2000).

A produção de compostos voláteis em frutos é dependente da sinalização do fitohormônio ET (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; WATKINS, 2006). Contudo, mesmo que o 1-MCP iniba ou atrase a produção de compostos voláteis vinculados ao aroma característico de um fruto, não necessariamente isso será comprometido a longo prazo. Por exemplo, em peras, o 1-MCP contribuiu para um atraso na produção de ésteres e álcoois, com diferenças quantitativas entre ésteres de cadeia longa e ramificados. Todavia, com o avanço da maturação, a produção de voláteis foi semelhante entre peras tratadas e não tratadas com 1-MCP (ARGENTA; FAN; MATTHEIS, 2003). Para maçãs, foi evidenciado que a síntese de álcool e éster foram inibidas em 'Fuji' (FAN e MATTHEIS, 1999) e 'Gala' (FAN e MATTHEIS, 2001) e que a produção de voláteis totais foi inibida em 'McIntosh' e 'Delicious' (RUPASINGHE et al., 2000). Diante das divergências de perfil de comportamento do 1-MCP sobre a produção de compostos voláteis, entende-se que, ao que tudo indica, o efeito do 1-MCP sobre esse atributo de qualidade vai muito além do aspecto relacionado a sua presença ou ausência.

2.3.2 1-MCP e os distúrbios fisiológicos e patogênicos

Os efeitos do 1-MCP sobre os distúrbios fisiológicos constatados em diversas culturas são detalhados por Watkins (2007). Sob um aspecto geral, distúrbios associados à senescência (“marronzamento” da polpa de abacate, do inglês *internal browning*), ao frio (escaldadura superficial de maçãs e peras) e diretamente relacionados ao fitorhormônio ET (escurecimento do alface, do inglês *browning*) são inibidos pelo 1-MCP, ao se inibir a ação do ET. Por sua vez, distúrbios vinculados ao frio e à ausência de ET (*chilling injury* de bananas e citrus) são aumentados na presença de 1-MCP (PORAT et al., 1999; DONG; LURIE; ZHOU; 2002; WATKINS, 2007, 2008b).

Embora o tratamento de frutos com o 1-MCP seja bastante utilizado na conservação pós-colheita, estudos sugerem que ele tenha relação com o aumento da incidência de patógenos em diversos frutos. Em 2008, Watkins descreveu exemplos em que o 1-MCP pode induzir, reduzir ou não ter efeito sobre a incidência de podridões em diversas culturas (WATKINS, 2008b), como ilustra a Figura 5.

Indução de podridões, em:



Redução de podridões, em:



Sem efeito, em:



Figura 5 – Efeito do 1-MCP sobre distúrbios patogênicos em diversas culturas (Watkins, 2008b).

Considerando que a maçã é, mundialmente, um alimento de grande valor econômico, e que o tratamento com 1-MCP é uma tecnologia de conservação utilizada nesse fruto, entende-se que é relevante investigar seu efeito sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças como a podridão “olho-de-boi”. No que diz respeito ao efeito do 1-MCP sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento de podridões características de pós-colheita, foi descrito que o tratamento pode tanto

umentar, diminuir ou, ainda, não ter efeito sobre o progresso de podridões em frutos, sendo isso relacionado, principalmente, com a concentração de 1-MCP (PORAT et al., 1999; JIANG; JOYCE; TERRY, 2001; MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005; BLANCO-ULATE et al., 2013), o estágio de maturação do fruto (SAFTNER; ABBOTT; CONWAY, 2003; DO AMARANTE et al., 2010; CAMELDI et al., 2016), e a ordem de tratamento com 1-MCP (SAFTNER; ABBOTT; CONWAY, 2003; JANISIEWICZ et al., 2003).

No trabalho que comprovou a hipótese de que o papel desempenhado pelo 1-MCP sobre a incidência de podridões tem relação com a concentração utilizada, foi evidenciado que: *i*) a menor concentração de 1-MCP (12 nL/L) foi a única que possibilitou um menor percentual de tomates podres com *B. cinerea*, independente do estágio de maturação; *ii*) ao comparar uma menor (12 nL/L) e maior concentração de 1-MCP (450 nL/L) foi suposto que baixas concentrações de 1-MCP podem bloquear alguns, mas não todos os receptores de ET, em função da limitada quantidade de 1-MCP utilizada e contínua geração de novos receptores, com isso o fitohormônio ET pode ser percebido numa concentração apropriada para promover resistência (BLANCO-ULATE et al., 2013). Outros trabalhos que investigaram a relação entre concentração do 1-MCP e incidência de podridões em frutos também evidenciaram que menores concentrações de 1-MCP possibilitam uma menor incidência de podridão quando comparado a maiores concentrações de 1-MCP (PORAT et al., 1999; JIANG; JOYCE; TERRY, 2001; MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005).

A síntese de compostos fenólicos (CF) e a atividade enzimas relacionadas a defesa também foram investigadas na relação concentração do 1-MCP e incidência de podridões em frutos. A principal evidência é de que menores concentrações de 1-MCP contribuem para maiores concentrações compostos fenólicos (CF), maior atividade de enzimas (PAL e ACO) e menor incidência de podridões (PORAT et al., 1999; JIANG et al., 2001; MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005; BLANCO-ULATE et al., 2013). Contudo, isso não deve ser encarado como via de regra, pois altas concentrações de 1-MCP (1000 nL/L) também contribuíram para uma maior atividade da enzima PAL, bem como de outras enzimas como CAT, SOD, POD, e PPO, sendo isso vinculado a uma maior resistência do fruto a *P. expansum* (LIU et al., 2005; ZHANG et al., 2012).

Compostos fenólicos são armazenados nos vacúolos e obtidos através das rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico. A classe de CF mais abundante em plantas é derivada da rota do ácido chiquímico. Essa rota converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose fosfato em três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. Dentre esses aminoácidos, a fenilalanina é o principal aminoácido responsável pela síntese de CF. Para tanto, a enzima PAL catalisa a reação de desaminação do aminoácido L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico e amônia (BUCHANAN et al., 2000; WESTON; MATHESIUS, 2013). Um dos exemplos mais importantes de compostos tóxicos a fitopatógenos derivados dos CF são as quinonas. Para se ter uma ideia, as quinonas acabam sendo caracterizadas como muito mais tóxicas aos microrganismos, do que o composto fenólico original (BROETTO; GOMES; JOCA, 2017). Durante a invasão de fitopatógenos, um dos mecanismos de resistência propostos é de que taninos são oxidados a quinonas e, subsequentemente, as quinonas, ao se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos ($-NH_2$ e $-NH$) de proteínas de microrganismos, desempenham a função de inibição do crescimento microbiano. Destaca-se que um dos mecanismos para interação de taninos com proteínas de fitopatógenos é através de ligações intermoleculares do tipo pontes de hidrogênio entre grupos hidroxila fenólicos dos taninos e os sítios eletronegativos da proteína (Figura 6 A). Um segundo mecanismo proposto é que para grupos hidroxila fenólicos interagirem com essas proteínas covalentemente, previamente, esse tanino deve ser convertido em quinona, após a ativação catalisada por enzimas oxidativas, como a PPO (Figura 6 B) (TAIZ e ZEIGER, 2017).

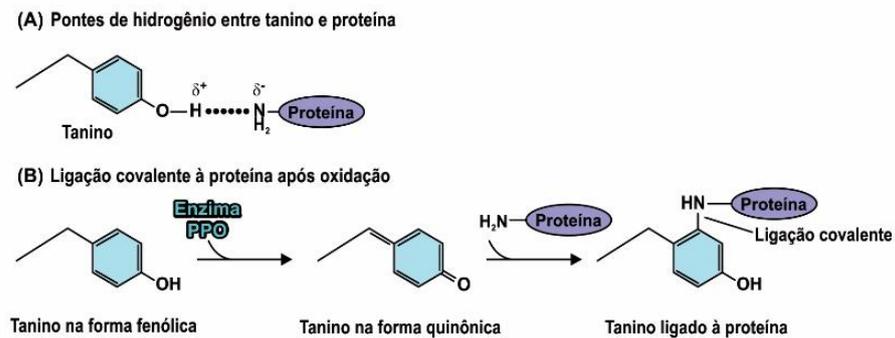


Figura 6 – Mecanismos propostos para interação de taninos com proteínas por pontes de hidrogênio entre taninos e proteína (A) e ligação covalente (B), adaptado de Taiz e Zeiger, 2017.

Durante a infecção de frutos por fungos, bactérias e outros microrganismos há também a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas, do inglês *pathogenesis-related*). Essas proteínas ficam localizadas no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto. Elas possuem como características serem resistentes a enzimas proteolíticas, estáveis em pH baixos, em torno de 2,8 e estáveis sob altas temperaturas (em torno de 60-70 °C) (STANGARLIN et al., 2010). Dentre as principais PR-proteínas associadas à defesa diante de um estresse biótico pode-se citar as quatro famílias de quitinases (PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11), uma família de β -1,3-glucanases (PR-2) e, ainda, uma família de proteínas que compartilham homologia com a taumatina e, portanto, chamada de proteínas semelhantes à taumatina (PR-5, *like-thaumatina*) (SUDISHA et al., 2012). As PR-proteínas 2, 3, 4, 8 e 11 degradam quitina e β -glicanas da parede celular de fungos, respectivamente (EBRAHIM; USHA; SINGH, 2011), enquanto que a PR-5 tem demonstrado atividade antifúngica *in vitro* em milho (ROBERTS e SELITRENNIKO, 1990), folhas de tabaco (KOIWA et al., 1997) e limão (KIM et al., 2009). Dentre as PR-proteínas mencionadas, a que pode ter potencial na inibição ou redução da podridão “olho-de-boi” em maçãs ‘MaxiGala’ é a família PR-5, visto que num estudo prévio foi demonstrado um maior acúmulo de PR-5 na presença de 1-MCP em maçãs ‘Gala’ clone Baigent (GONÇALVES, 2016).

Na presença de fitopatógenos, é descrito na literatura com a seguinte ordem de desencadeamento dos eventos em plantas: *i*) nos primeiros minutos ocorre despolarização da membrana e vazamento de eletrólitos, maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), como H_2O_2 , e expressão de genes relacionados à síntese de fitoalexinas; *ii*) nas primeiras horas acontece a explosão

oxidativa (evento ligado a ERO), peroxidação da membrana plasmática, aumento da concentração do fitohormônio ácido salicílico, morte localizada de células, acúmulo de fitoalexinas e lignificação da parede celular e, por fim, *iii*) após alguns dias têm-se o acúmulo de PR-proteínas e o desencadeamento de sistema adquirido de resistência (GUEST e BROWN, 1997).

Outra esfera na compreensão dos eventos desencadeados na relação 1-MCP e suscetibilidade ao desenvolvimento de podridões em frutos são vinculadas ao estágio de maturação do fruto. Nesse sentido, até o momento, foram evidenciados os três principais pontos: *i*) na presença do 1-MCP, foi constatado um menor percentual de maçãs podres por *Neofabraea* spp., independente da colheita ser precoce ou tardia (CAMELDI et al., 2016); *ii*) o 1-MCP proporcionou uma menor incidência de podridões em maçãs, independente do momento escolhido para esse tratamento (0 ou 20 dias após a colheita) (DO AMARANTE et al., 2010); e, *iii*) sobre uma mesma colheita, a presença do 1-MCP só conseguiu proporcionar menor diâmetro da lesão das podridões *B. cinerea*, *C. acutatum* e *P. expansum* quando esse tratamento foi realizado previamente ao armazenamento das maçãs. Após 2,5 meses de armazenamento maçãs com e sem 1-MCP tiveram lesões com o mesmo diâmetro (SAFTNER; ABBOTT; CONWAY, 2003). Nesse terceiro relato, os autores atribuíram à distinção de resultados, em virtude de o pico climatérico ter sido atingido após 2,5 meses de armazenamento. O que parece ter diferenciado esses três aspectos foi o tempo em que se levou para tratar frutos com 1-MCP. Entende-se que quanto maior o espaço de tempo entre colheita e aplicação do 1-MCP, maior a probabilidade de o fruto atingir o pico climatérico, amadurecer, e, portanto, diminuir o efeito do 1-MCP sobre a indução de resistência a podridões.

Um dos principais atributos relacionados ao estágio de maturação é a FP do fruto. Dizer que um fruto está menos firme, significa que ele está mais maduro. Há uma discussão que descreve que frutos mais amolecidos, por estarem mais maduros, facilitam o desenvolvimento de podridões (ALKAN e FORTES, 2015). Esse raciocínio parte da ideia de que a barreira à invasão, representada pela parede celular, está mais frágil quando o fruto está mais maduro. Dentre algumas evidências tem-se que fungos sintetizam enzimas hidrolíticas de parede celular, como PGs, PMEs e enzimas que degradam celulose e hemicelulose, para facilitar sua invasão durante a tentativa de colonização. Os frutos que tiveram genes que codificam para enzimas degradantes de parede celular silenciados (PG, expansina e

β -1,4-glucanase) foram mais resistentes a patógenos (*B. cinerea*, *Geotrichum candidum* e *Rhizopus stolonifer*), enquanto outros estudos demonstraram que o silenciamento do gene PG foi indiferente em relação à suscetibilidade de *Colletotrichum gloeosporoides* e *B. cinerea* em frutos (CANTU et al., 2008). Considerando que enzimas degradantes de parede celular são etileno-dependentes ou parcialmente-dependentes (ALKAN e FORTES, 2015), a priori, frutos com 1-MCP teriam mais dificuldade para serem colonizados do que frutos sem 1-MCP, uma vez que o 1-MCP bloqueie a ação do ET no fruto e contribui para preservar a parede celular. Na verdade, isso não deve ser encarado como via de regra, pois um estudo com 1-MCP em peras demonstrou que não há relação entre firmeza de polpa e desenvolvimento de *B. cinerea*. Os autores comprovaram que quem influenciou uma maior ou menor suscetibilidade ao desenvolvimento de podridão foi a enzima secretada pelo fungo, PG. Para tanto, os autores avaliaram o desenvolvimento dessa podridão inoculando cepas de *B. cinerea* com e sem silenciamento do gene PG e PME em peras. Concluiu-se que a colonização do fungo foi dependente apenas da enzima PG e, por isso, sugeriu-se que enzimas PG sintetizadas por *B. cinerea* conseguem atuar sobre os polímeros da pectina da parede celular de peras sem a desmetilação prévia realizada por enzimas PME (AKAGI e STOZ, 2007).

Em paralelo ao trabalho das enzimas PG, sintetizadas por fungos – há, por parte do fruto, a síntese de proteínas que impedem que enzimas PG, secretadas por fungos, degradem a parede celular. Essas são conhecidas como proteínas inibidoras de PG (PGIPs). PGIPs se ligam à pectina da parede celular do fruto (CANTU et al., 2008). Na literatura é destacado que PGIPs inibiram a ação de PGs durante a infecção de *B. cinerea* em peras; que a superexpressão de PGIPs em tomates maduros permitiu que esses frutos fossem mais tolerantes a *B. cinerea* e a *Valsa mali* em maçãs; que tomates e uvas transgênicas por expressarem PGIPs limitaram a colonização de *B. cinerea* (ALKAN e FORTES, 2015, YIN et al., 2016). Deve-se esclarecer que PGIPs inibem somente enzimas PG sintetizadas por patógenos, e não aquelas sintetizadas por frutos (CANTU et al., 2008). A interação PG-PGIP resulta no acúmulo de oligogalacturonídeos (OGs), que são elicitores ativos, os quais ativam respostas de defesa no fruto, incluindo o acúmulo de ERO e de proteínas PR. Um modelo de eventos desencadeados em *Arabidopsis thaliana* em defesa a um ataque patogênico descreve que OGs são liberadas da parede celular, após degradação de homogalacturonano por dano mecânico ou enzimas hidrolítica

como PG secretadas por patógenos. PGIPs, no apoplasto, modulam a atividade de enzimas PG, favorecendo o acúmulo de OGs, que acabam funcionando como padrões moleculares associados a danos. OGs ligam-se a uma proteína ligada à pectina da parede celular (WAK1) e, a partir disso, respostas de defesa à invasão são desencadeadas (FERRARI et al., 2013).

A maior parte dos trabalhos apresentados até aqui detiveram-se em relacionar o papel desempenhado pelo 1-MCP sobre a incidência de podridões, a partir de diferentes concentrações 1-MCP. Paralelamente, encontram-se avaliações relacionando o papel do 1-MCP sobre a atividade de enzimas relacionadas à patogênese e sobre a concentração de compostos fenólicos (PORAT et al., 1999; JIANG; JOYCE; TERRY, 2001; MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005; BLANCO-ULATE et al., 2013). Um ponto raramente discutido e que deve ser considerado é a contribuição de variáveis intrínsecas, como o caso de safra e estágio de maturação, na relação efeito do 1-MCP e incidência de podridões. Nesse caso, foi evidenciado que o papel do 1-MCP sobre a incidência da podridão “olho-de-boi” em maçãs é diferente dependendo da safra e estágio de maturação, que ele interagir (CAMELDI et al., 2016). Na literatura, é descrito que na fase de desenvolvimento vegetativo-reprodutivo, estiagens prolongadas, precipitações de granizo, pluviosidade em excesso são prejudiciais, visto que, além de diminuir a quantidade do que se produz, podem causar lesões na epiderme, reduzir o tamanho ou aumentar a incidência de podridões nos frutos (FIORAVANÇO; CZERMAINSKI; ALVES, 2012). Ou seja, não considerar variáveis intrínsecas nas investigações pode resultar num viés do real efeito do 1-MCP sobre a incidência de podridões em frutos. Logo, acredita-se que, juntamente a avaliação de diferentes estágios de maturação, é importante que se faça avaliações considerando mais de uma safra.

Um segundo ponto pouco abordado e que parece desencadear respostas distintas ao 1-MCP sobre podridões em frutos é a ordem escolhida para esse tratamento. Por exemplo, na literatura sobre um mesmo fungo (*P. expansum*) e um mesmo fruto (maçãs ‘Golden Delicious’), o efeito do 1-MCP foi diferente, isto é, enquanto um estudo relatou que maçãs com 1-MCP apresentaram menor incidência de *P. expansum* (SAFTNER; ABBOTT; CONWAY, 2003), outro descreveu o contrário (JANISIEWICZ et al., 2003). No primeiro caso, o 1-MCP foi utilizado antes da adição do fungo, enquanto no segundo, depois da inoculação. Entende-se que embora uma maior ou menor incidência de podridão englobe variáveis que vão além

da ordem do tratamento com 1-MCP, parece que dependendo dessa ordem tem-se um ou outro comportamento sobre a incidência de podridões em frutos.

Até o momento, há poucos estudos (PORAT et al., 1999; JIANG et al., 2001; MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005; BLANCO-ULATE et al., 2013) que explicam a relação do 1-MCP como responsável por uma maior ou menor incidência de uma determinada podridão em frutos. O senso comum é de que o uso do 1-MCP contribui na manutenção da qualidade da maçã armazenada (KIST et al., 2017). Contudo, há ainda muitas perdas vinculadas às podridões durante o armazenamento (PETRIACQ; LÓPEZ; LUNA, 2018). Como visto, somente a podridão “olho-de-boi” em maçãs é relacionada ao descarte de, em média, 60 mil toneladas de maçãs brasileiras, se somadas as perdas ocorridas durante e após o armazenamento, o que representa quase 9% do total da capacidade de armazenagem (700 mil toneladas) (EMBRAPA, 2018). Diante disso, entende-se que investigar o efeito do 1-MCP em associação a variáveis intrínsecas (safra e estágio de maturação) pode colaborar para uma maior compreensão do assunto.

3. Hipótese

A aplicação de 1-MCP influencia no aumento da podridão “olho-de-boi” em maçãs armazenadas.

4. Objetivo geral

Verificar a nível fisiológico, metabólico e transcricional se a aplicação de 1-MCP influencia na ocorrência de podridão “olho-de-boi” em maçãs ‘MaxiGala’ durante o armazenamento refrigerado em atmosfera controlada.

4.1 Objetivos específicos

1. Verificar se aplicação de 1-MCP em diferentes pontos de colheita influenciam na incidência da podridão “olho-de-boi”;
2. Verificar se a aplicação de 1-MCP altera o perfil transcricional de genes relacionados a resistência a podridões no fruto;
3. Verificar se há relação entre firmeza de polpa e incidência de podridões.

5. Materiais e métodos

5.1 Maçãs

Maçãs 'MaxiGala' foram colhidas em dois estádios de maturação em duas safras (2017 e 2018). Em ambas safras, a primeira colheita ocorreu quando os frutos apresentavam maturação ideal para 'Gala' [firmeza de polpa (FP) entre 75,5 N e 83,6 N, sólidos solúveis totais (SST) acima de 11 °Brix, acidez titulável (AT) entre 0,348% e 0,402% de ácido málico e iodo-amido entre 2 – 3 (GIRARDI et al., 2002)] para serem mantidas por longos períodos de conservação. A segunda colheita foi realizada cerca de 25 dias após a 1ª colheita. As maçãs foram oriundas do pomar da Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado da Embrapa Uva e Vinho, em Vacaria/Rio Grande do Sul, a partir de duas fileiras previamente selecionadas, levando em consideração que não foram aplicados nenhum tipo de regulador da maturação [ANA (ácido α -naftaleno acético), nem AVG]. Em todas as colheitas, a escolha das maçãs se deu de forma aleatória. No total, foram colhidas em média 150 maçãs/caixa, totalizando, em média, 1800 frutos (12 caixas, medida da caixa 55,5 x 36 x 30 cm).

Posteriormente às colheitas, foram descartados frutos com sarna, queimadura por sol ou alguma lesão por dano mecânico. Em média, na 1ª colheita de cada ano, foram descartados 150 frutos, enquanto na 2ª foram descartados 300 frutos. A seguir, as maçãs foram desinfetadas imergindo os frutos em hipoclorito de sódio (50 ppm, pH 6,7, 2,0- 2,5% cloro ativo, densidade = 1,2 g/mL) por 2 min, sendo posteriormente secos com panos de algodão. Em seguida, as maçãs foram colocadas dentro de caixas plásticas, previamente lavadas com sabão líquido e água potável e higienizadas com etanol 70% (v/v) (adaptado de Zhang et al., 2012; Li et al., 2017).

5.2 Delineamento experimental

A seguir é apresentado uma ilustração com a cronologia dos eventos envolvidos entre a colheita e fim do período de armazenamento, independente da safra (Figura 7).



Figura 7 – Ilustração da cronologia dos eventos envolvidos entre a colheita e fim do período de armazenamento, independente da safra.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental constituída por 10 maçãs, utilizando 10 repetições biológicas (10 frutos por repetição), totalizando 100 maçãs por tratamento. A seguir é apresentado o delineamento experimental utilizado no estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Delineamento experimental para a avaliação do efeito do 1-MCP sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento da podridão 'olho-de-boi' em maçãs 'MaxiGala' armazenadas sob refrigeração e atmosfera controlada

Variáveis independentes	Variáveis dependentes
Ordem de aplicação do tratamento com 1-MCP (antes e depois inoculação com fungo)	Diâmetro da lesão
Presença do 1-MCP (com e sem)	Percentual de frutos podres
Presença do fungo (com e sem)	Amolecimento de polpa, SST e AT
Safra (2017 e 2018)	Expressão dos genes que codificam para as enzimas ACO, PAL, PPO, PG e para as proteínas PGIP e família PR-5
Colheita (1ª e 2ª)	
Presença da ferida (com e sem)*	
Tempo (10 e 90 dias)*	

*realizado somente para a avaliação transcricional

5.3 Tratamento com 1-MCP

Para o tratamento com 1-MCP foi utilizado o produto comercial AgroFresh™ (Dow Chemical Company) contendo 0,14% do princípio ativo. No tratamento, as

maçãs foram acondicionadas em caixas plásticas hermeticamente fechadas (140 L), onde permaneceram a 18 °C (± 2 °C) por aproximadamente 18 h.

Com o intuito de avaliar se a ordem do tratamento com 1-MCP (1 ppm) influenciava na incidência da doença, maçãs foram tratadas 24 h antes da inoculação com o fungo (100 maçãs) ou água estéril (100 maçãs). O mesmo procedimento foi considerado para maçãs tratadas com 1-MCP 48 h depois da inoculação com o fungo ou água estéril.

5.4 Inoculação

Até ser realizada a inoculação, os frutos foram mantidos numa câmara de refrigeração ($0 \pm 0,5$ °C, umidade relativa, UR, de 90 ± 5 %) na Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS. No dia da inoculação, entre 4 e 6 h antes de ser realizado esse procedimento, as maçãs foram retiradas da câmara de refrigeração, sendo mantidas na antecâmara (20 ± 3 °C) para que a temperatura interna dos frutos não estivesse muito baixa, de forma a dificultar a colonização pelo fungo.

Para inoculação, os frutos com e sem 1-MCP foram previamente feridos (um ferimento por fruto) com um palito roliço de madeira (0,2 cm largura e 1 cm de profundidade). Na sequência, com o auxílio de uma micropipeta (10 μ L) foram inoculados em cada ferimento 10 μ L da suspensão (10^6 conídios/mL) dissolvida em água estéril. As maçãs permaneceram sobre a bancada em que estavam por 20 min. A seguir, os frutos foram postos em caixas plásticas (55,5 x 36 x 30 cm), previamente higienizadas, contendo vários papéis-toalha umedecidos com água destilada postos na superfície interior de cada caixa. As caixas foram mantidas a 20 °C (± 2 °C) durante aproximadamente 48 h. Na sequência, as maçãs foram separadas por redes para distinguir os tratamentos e as repetições biológicas. Para a inoculação foi utilizado o isolado Cp5 de *N. brasiliensis*, da coleção CNPUV/Va-5 (SisGen - A99F2F2). O procedimento de inoculação descrito foi desenvolvido pela Dr^a. Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, a partir de adaptações de outros estudos (BARTNICKI et al., 2010; BARTNICKI et al., 2011).

O armazenamento foi realizado a $0 \pm 0,5$ °C, UR $90 \pm 3\%$ e concentração de gases de 0,6% de O₂ e 1,0% de CO₂, sendo o período de armazenamento de 90 dias.

5.5 Análises

5.5.1 Características físico-químicas

Após ter sido realizada a classificação e desinfestação das maçãs, 30 frutos foram escolhidos ao acaso para avaliar os atributos clássicos de qualidade FP, SST, AT e o índice de iodo-amido. Previamente às análises, 30 frutos foram separados em três repetições biológicas (10 frutos/repetição). Após a análise da FP de cada repetição biológica, foi preparado um suco da polpa da maçã (multiprocessador Premium, Mondial). O SST foi medido diretamente no suco de polpa, enquanto a AT foi medida a partir do preparo de três repetições analíticas de cada repetição biológica, utilizando método titulométrico.

A FP foi determinada com penetrômetro automático (modelo GS 15, *Fruit Texture Analyzer*) munido de ponteira de 11 mm. Em cada maçã foram realizadas duas leituras na seção equatorial, em faces diametralmente opostas, após remoção da epiderme, sendo os resultados expressos em Newton (N). O SST foi determinado com um refratômetro digital (modelo PR-32 α , Atago[®]) a 20 °C, sendo os resultados expressos em °Brix. A AT foi determinada através da análise volumétrica de neutralização com hidróxido de sódio 0,1 mol/L, fenolftaleína (indicador, pH 8,1-8,2), 10 mL do suco da polpa do fruto diluído em 90 mL de água destilada, sendo os resultados expressos em % de ácido málico (AM). Tanto o SST, quanto a AT foram realizadas conforme descrito no Instituto Adolfo Lutz (2008).

Para a análise do índice de iodo-amido, cinco dos 30 frutos foram cortados na zona equatorial e a metade peduncular foi imersa em solução de iodo (12 g de iodo metálico e 24 g de iodeto de potássio) por 30 s. Quando retirados da imersão, a presença de amido foi avaliada comparando-a com os valores da tabela elaborada por Werner (1989), na qual o índice 1 representa o teor máximo de amido e o índice 5 ausência do mesmo (GIRARDI, 2004).

5.5.2 Isolamento de tecido de maçã sadio e infectado com a podridão “olho-de-boi”

Para confirmar se as maçãs estavam colonizadas com o fungo característico da podridão “olho-de-boi”, após a maçãs permanecerem por 90 dias de armazenamento em refrigeração e AC foi realizada a incubação de uma mistura entre tecido inoculado e sadio em placas com ágar batata dextrose, entre 7 e 10 dias, a 20 ± 2 °C.

5.5.3 Maçãs inoculadas com água estéril

O grupo de maçãs inoculadas com água estéril ao invés de inoculação com fungo serviu para monitorar os seguintes aspectos, *i)* se a água estéril utilizada estava realmente estéril, *ii)* se a desinfestação com hipoclorito de sódio, descrito anteriormente, foi suficiente para não permitir a infecção de podridões gerais durante o armazenamento.

Após finalizado o período de armazenamento em AC (90 dias), fizeram-se registros fotográficos de todos os tratamentos com água estéril.

5.5.4 Percentual de frutos podres e diâmetro da lesão

O percentual de frutos podres foi obtido a partir da contagem total de frutos que apresentaram a podridão, em relação a contagem total de frutos inoculados. Para estimar o diâmetro da lesão (mm) foi utilizado um paquímetro digital (incerteza 0,01). O diâmetro da lesão foi calculado de acordo com a Fórmula 1:

$$\text{Diâmetro da lesão} = \frac{(\text{medida horizontal} + \text{medida vertical})}{2} \quad (1)$$

Cabe destacar que foram considerados como frutos podres aqueles que apresentaram lesões características da doença, com diâmetro de podridão acima de 4 mm.

5.5.5 Amolecimento de polpa e *ratio* (SST/AT)

Após 90 dias de armazenamento em câmara fria foram avaliados amolecimento de polpa (diferença entre a FP da colheita e FP após o armazenamento) e a razão entre SST e AT. Para medir a FP, SST e AT, após os 90 dias de armazenamento foram selecionadas, a partir de um sorteio, três das 10 repetições biológicas de cada tratamento. O procedimento envolvendo cada uma dessas análises seguiu o que foi descrito no item 5.5.1.

5.5.6 Análise de acúmulo relativo de transcritos

A análise de acúmulo relativo de transcritos englobou as seguintes etapas: *i*) extração e quantificação de RNA (ácido ribonucleico); *ii*) verificação da qualidade do RNA total em gel de agarose 1% (m/v); *iii*) síntese de cDNA (DNA complementar); e *iv*) quantificação do acúmulo relativo de mRNA dos genes-alvo do estudo.

5.5.6.1 Material biológico

Após 10 e 90 dias de armazenamento, 05 maçãs de cada tratamento foram removidas do armazenamento refrigerado em AC, sendo separadas a região circundante ao local da infecção de cada tratamento, e congelados com N₂ líquido. A seguir, o material biológico de cada tratamento foi armazenado a - 80 °C em ultra freezer até o momento da extração do RNA total.

5.5.6.2 Extração de RNA total

Primeiramente, as amostras foram trituradas em um moinho de bolas com câmara fechada (modelo MA350, MARCONI) com uma bola de inox (ISI304). Todo procedimento foi realizado na presença de N₂ líquido. A extração de RNA total foi realizada com aproximadamente 6 g de amostra macerada, conforme descrito por Zeng e Yang (2002) com adaptações. Foi acrescentada uma etapa de precipitação com acetato de sódio 3 mol/L (pH 5,5) e isopropanol refrigerado (4 °C), seguido de uma agitação vigorosa e repouso a - 80 °C por 25 min. A seguir, a amostra foi centrifugada a 20.000 x *g* a 4 °C por 20 min. O precipitado foi diluído em 70 µL de

água *nuclease free* (Invitrogen®). Posteriormente, foi adicionado cloreto de lítio 10 mol/L, com posterior repouso *overnight* para que ocorresse a precipitação da pectina ainda presente. Por fim, foram realizadas três lavagens (500 µL/lavagem) com etanol 75% v/v.

O RNA total extraído foi quantificado através da análise de absorvância (260) e a pureza através da razão 260/280nm e 260/230 em espectrofotômetro Epoch (BioTek) com o software Gen5. A integridade do RNA total extraído foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 1% m/v corado com 1 µL do fluoróforo GelRed™ (Biotium). A eletroforese foi realizada no sistema PowerPac™ Basic, Bio-Rad (corrida: 50 min, 80 V) e a visualização do gel no fotodocumentador Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad).

5.5.6.3 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen™) para eliminação de contaminação com DNA genômico. Os cDNAs *in vitro* foram obtidos a partir de 1 µg de RNA total, de acordo com os seguintes passos: em um tubo livre de RNases adicionou-se o volume previamente calculado de RNA total para uma concentração de 1 µg, 2,3 µL de DNase I (100 U), 1,5 µL de 10x DNase I *Reaction Buffer*, completando para um volume total de 10 µL com água livre de nucleases. Essa solução foi aquecida no termociclador (MJ RESEARCH-PTC-100™ Gradient Peltier Thermal Cycler) a 25 °C por 20 min, sendo, posteriormente, adicionado nela 1 µL de EDTA (25 mmol/L; pH 8,0), para a seguir realizar um novo aquecimento a 65 °C por 10 min.

Para comprovar a eliminação do DNA contaminante, os RNAs tratados com DNase I foram submetidos à reação em RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) no equipamento 7500 Fast Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando *primers* para gene constitutivo (xxxx). O volume final das reações foi 15 µL, sendo 7,5 µL do kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 0,6 µL de *primer*, isto é, 0,3 µL de cada (F/R), 5,9 µL de água livre de nucleases e 1 µL de RNA tratado com DNase I. As condições de reação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C (15 s), 60 °C (1 min) e 72 °C (30 s), com extensão final por 72 °C por 10 min.

Os RNAs livres de contaminação com DNA foram submetidos à síntese de cDNA com o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen™), seguindo as recomendações do fabricante. Para tanto, nos RNAs foram adicionados 1 µL oligo(dT)₂₀ 50 µmol/L e 1 µL de tampão de anelamento, sendo, a seguir, submetidos a aquecimento no termociclador a 65 °C por 5 min, seguido de resfriamento a 0 °C por 1 min. Na sequência, foram adicionados 10 µL do 2x mix *First-Strand Reaction* (cloreto de magnésio 10 mmol/L e dNTPs 1 mmol/L) e, posteriormente, 2 µL do mix (RNaseOUT™ e SuperScript™ III).

A verificação da qualidade dos cDNAs sintetizados foi realizada por RT-qPCR no equipamento 7500 Fast Real Time PCR Systems (Applied Biosystems®) utilizando *primers* para gene constitutivo (*MdUBC*, *MdPDI* e *MdH1*). O volume final das reações foi 15 µL, sendo 7,5 µL do kit SYBR® Green PCR Master Mix, 0,6 µL de *primer* (F/R), 5,9 µL de água livre de nuclease e 1 µL de cDNA. As condições de reação foram as mesmas descritas para comprovar a eliminação do DNA contaminante.

5.5.6.4 Quantificação relativa dos transcritos por RT-qPCR

Nesse estudo foi avaliado o acúmulo relativo de transcritos de genes relacionados à suscetibilidade ao desenvolvimento de podridões em frutos com base em estudos anteriores (SU et al., 2011; ZHANG et al., 2012; BLANCO-ULATE et al., 2013; YIN et al., 2016; GONÇALVES, 2016; CAMELDI et al., 2016).

O desenho dos *primers* para análise em RT-qPCR foi realizado através do programa Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007), respeitando os seguintes parâmetros: formação de um amplicon de tamanho variando entre 50 e 150 pb, presença de CG entre 40% e 60% e temperatura de anelamento variando entre 60 e 65°C.

Foram analisados os níveis de expressão dos genes apresentados na tabela 2 em relação a 6 tratamentos (1. maçãs com ferida, com fungo e com 1-MCP; 2. maçãs com ferida, com fungo e sem 1-MCP; 3. maçãs com ferida, com água estéril e com 1-MCP; 4. maçãs com ferida, com água estéril e sem 1-MCP; 5. maçãs sem ferida e com 1-MCP; 6. maçãs sem ferida e sem 1-MCP), em 10 e 90 dias após o armazenamento refrigerado em AC, em dois anos (2017 e 2018) para duas colheitas (1ª e 2ª) por ano, conforme esquematizado na figura 8.

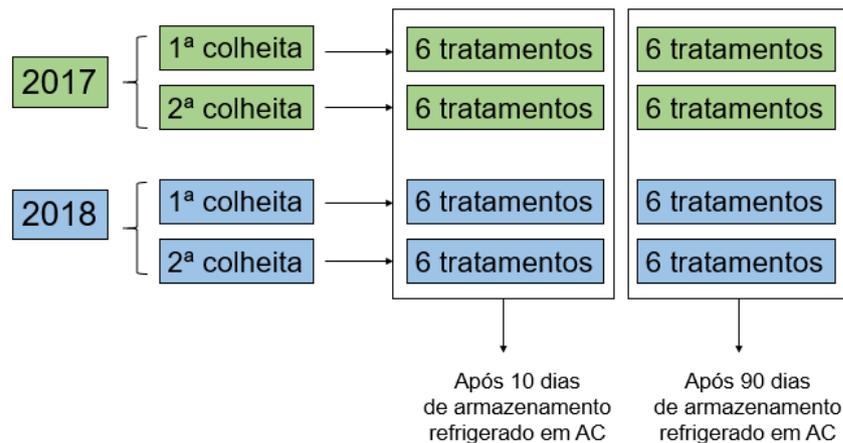


Figura 8 – Esquema do que foi analisado por expressão gênica para investigar o efeito do tratamento com 1-MCP, quanto a suscetibilidade de maçãs armazenadas sob refrigeração e atmosfera controlada à podridão “olho-de-boi”.

Os dados de expressão do gene “alvo” foram normalizados em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos, considerando que estes foram os mais estáveis de acordo com software Normfinder. O programa estima a variação de expressão tanto intragrupo, quanto intergrupo e calcula os valores de estabilidade do gene candidato (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTTOFT, 2004).

As curvas de eficiência de amplificação para cada par de *primers* dos genes “alvo” e dos genes de referência (*MdUBC*, *MdPDI* e *MdH1*) foram obtidas a partir de uma série de diluições (1:1; 1:5; 1:25; 1:125; 1:625) de um mix de um *pool* de cDNAs contendo todos os tratamentos de duas colheitas (2ª colheita de 2017 e 1ª colheita de 2018). Também foram geradas curvas de dissociação para verificar a especificidade dos *primers*. Essas curvas padrão foram representadas através de um gráfico de regressão linear do valor Ct (*Threshold Cycle*) em comparação ao log das diluições de cDNA, apresentando um valor denominado de *slope*. O *slope* é a inclinação da curva padrão gerada pelos dados: log da concentração das amostras x Ct. O Ct é o ponto em que a curva de amplificação tem fase de crescimento com ângulo igual ou próximo a 45 graus entre as coordenadas x e y, isto é, ciclo da PCR vs. fluorescência dos amplicons, neste ponto a curva é cortada por uma linha (*Threshold*). O valor Ct é utilizado tanto para cálculos da eficiência dos *primers* quanto para estimar as diferenças na quantidade de transcritos em diferentes amostras.

Tabela 2 - *Primers* utilizados para análise em RT-qPCR

Gene	Sequência dos primers		
	ID	Forward	Reverse
Biossíntese de etileno			
ACO1 (ACC oxidase)	MDP0000195885	CAATGCACCACTCCATTGTC	TCCCATCCGACTGAGCTATC
Degradação de parede celular			
endoPG28 (endopoligalacturonases)*	MDP0000326734	TCACGGTAACTGCACCAGAG	CTTTGGGACCCACTCACAAT
PGIP I (inibidora de poligalacturonases)	MDP0000728753	CCGTCCTAAAACCCGCTCTC	ACCAATCACAACAGTCAGTGTC
Biossíntese de compostos fenólicos			
PAL (fenilalanina amônia liase)	MDP0000388769	TCAGTCCGTCGATTTGAGGC	CGCAGAATCTTGAGGGGTGA
PPO (polifenoloxidase)	MDP0000699845	GTGGTGAAGAGACCGAAGCA	CACGTCCCTGTCAAACCTCGA
Proteína relacionado a patogênese (PR-5)			
<i>Thaumatococcus</i> <i>thaumatin-like protein</i> (família de proteínas com homologia a taumatina, PR-5)*	MDP0000218699	CTCCATCTCCATGGTCTGGT	AAAGTTGCTGGTGGAACCTGC
	MDP0000246775		
Referência			
UBC (ubiquitina)	MDP0000205182	TTGCTGGTGATCTCTGCATC	AGACCCACCTACTCCCGTCT
PDI (disufito isomerase)	MDP0000233444	TGCTGTACACAGCCAACGAT	CATCTTTAGCGGCGTTATCC
H1 (histona)	MDP0000223691	CATATTTGGCAGCAGAGCAA	CTCGTTAGCCAACCTGCATCA

O ID corresponde ao genoma *Malus x domestica* v.1.0.

*No que for apresentado a seguir: *MdendoPG28* foi abreviado para *MdPG* e *thaumatin-like protein* foi abreviado para *Mdthau*

A eficiência de cada conjunto de *primers* para utilizar em reações de RT-qPCR foi determinado através do cálculo utilizando a fórmula: $E = 10^{(-1/slope)}$ descrita por Rasmussen (2001). O valor da eficiência deve ser próximo a 100% ($\pm 20\%$) e deve ser semelhante entre gene de referência e gene alvo. O valor de R^2 (coeficiente de determinação), ainda é gerado a partir da curva padrão e indica o quanto os valores C_t sobrepõem os pontos da reta obtida pelos valores log das diluições (Tabela 3). Quanto mais parecidas estiverem as réplicas sobre a reta melhor será a eficiência do inicializador.

Tabela 3 - Eficiência dos genes utilizados a partir da validação por RT-qPCR

Gene	Slope	R ²	Eficiência
<i>MdACO1</i>	-3,678	0,998	87
<i>MdPG</i>	-3,242	0,894	103
<i>MdPPO</i>	-3,459	0,965	95
<i>MdPGIP I</i>	-3,162	0,959	107
<i>MdPAL</i>	-3,236	0,883	104
<i>Mdthau</i>	-3,624	0,996	88
<i>MdPDI</i>	-3,716	0,918	86
<i>MdH1</i>	-3,326	0,980	100
<i>MdUBC</i>	-3,182	0,915	106

As reações foram conduzidas no equipamento 7500 Fast Real Time RT-qPCR Systems (Applied Biosystems®). O volume final das reações foi 15 μ L, sendo 7,5 μ L do kit SYBR® Green PCR Master Mix, 0,6 μ L de primer (F/R), 5,9 μ L de água livre de nuclease e 1 μ L da primeira fita de cDNA (diluição 1:25, selecionado com base nos resultados das análises de validação). As amostras foram acondicionadas em *strips* (*MicroAmp® Fast Reaction Tubes*, 0,1 mL) e *caps* (*MicroAmp® Optical 8-Cap Strip*) específicos para o modelo e marca do equipamento.

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 95 °C (10 min), seguido de 40 ciclos de 95 °C (15 s), anelamento, que variou conforme o primer de 60 °C a 63 °C, durante 1 min, extensão a 72 °C (30 s), ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo. Por último, a extensão final de 72°C por 5 min. Foram utilizadas três replicatas analíticas por tratamento e três controles negativo (sem cDNA) para comprovar a ausência de contaminação nas soluções utilizadas.

Como amostras calibradoras foram utilizadas maçãs sem ferida e sem 1-MCP, armazenadas por 10 e 90 dias. As maçãs que permaneceram armazenadas por 10 dias tiveram seus resultados expressos em relação a amostra calibradora que esteve por 10 dias armazenada, enquanto as maçãs armazenadas por 90 dias tiveram seus resultados expressos em relação a outra amostra.

A quantificação relativa (QR) de cada gene foi feita utilizando o método do Ct comparativo, como descrito por Livak e Schmittgen (2001). A equação apresentada abaixo (fórmula 2) foi calculada de acordo com a diferença entre gene alvo e gene de referência (ΔCt) e, a seguir, a diferença entre os ΔCt da amostra alvo e amostra calibradora (PFAFFL, 2001).

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene de referência} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ amostra calibradora} \\ QR &= 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (2)\end{aligned}$$

O perfil dos genes foi apresentado na forma de diagrama de cores (*heatmap*), utilizando, para isso, o programa *Multiple Experiment Viewer* (TIGR MeV) versão 4.9 (SAEED et al., 2003). Previamente à inserção dos dados no programa, os valores de cada QR foram transformados para log 2, a fim de possibilitar uma única escala abrangendo todos os genes no *heatmap*.

5.6 Análise estatística

Para avaliar se as variâncias eram ou não homogêneas e se houve pelo menos um tratamento diferente dos demais aplicou-se o teste F ($\alpha = 0,05$). O teste t de Student (nível de significância 0,05) foi utilizado para avaliar se houve diferença na incidência da doença entre maçãs com e sem 1-MCP para uma mesma ordem de adição deste tratamento e para ordens de adição diferentes (antes ou depois de ter inoculado com o fungo). O mesmo teste foi também utilizado para avaliar se alguma variável independente (safra, colheita e presença do 1-MCP e fungo) apresentou efeito significativo sobre a incidência da doença e amolecimento de polpa e SST/AT (*ratio*). O teste de Tukey (nível de significância 0,05) foi aplicado para mensurar

qual(is) tratamento(s) possibilitou(ram) menor(es) incidência da doença, amolecimento de polpa e *ratio*.

Um planejamento fatorial (2^3), em que 2 representa os níveis envolvidos por fator, e 3 representa os fatores (fator 1: safra, fator 2: colheita e fator 3: presença do 1-MCP) foi elaborado para avaliar qual(is) tratamento(s) possibilitou(ram) menor(es) incidência de podridão, bem como para analisar os efeitos dos fatores, dois a dois. Um segundo planejamento fatorial (2^4) foi elaborado com o intuito de avaliar a presença de um quarto fator (fator 4: presença do fungo) sobre o comportamento do amolecimento de polpa e *ratio* (relação entre SST e AT).

Uma análise de correlação de Pearson foi aplicada para verificar de que forma as variáveis independentes (fatores 1, 2, 3 e 4) se correlacionam com as variáveis dependentes (% de frutos podres, diâmetro da lesão, amolecimento de polpa e *ratio*), como também se correlacionaram entre si (dependentes *versus* dependentes e independentes *versus* independentes).

Todos os testes estatísticos aplicados foram analisados no programa STATISTICA versão 13.

Os valores relacionados à medida do diâmetro da lesão da podridão “olho-de-boi” nas maçãs foram avaliados pelo teste Q para decidir se algum resultado suspeito deveria ser mantido ou rejeitado, de acordo com um valor crítico para o nível de significância de 0,05 e 10 observações (Q crítico = 0,464) (PIMENTEL-GOMES, 1978). Quando o teste Q sugeriu rejeitar algum valor dentro de uma repetição biológica repetiu-se a medida.

6. Resultados e discussão

6.1 Características das maçãs por ocasião da colheita

Antes da colheita fez-se um monitoramento, de sete em sete dias, de variáveis relacionadas à qualidade do fruto até o momento em que apresentassem os critérios desejados para auxiliar no teste de hipótese do trabalho. A partir do monitoramento, foram realizadas duas colheitas por safra, intervalados por cerca de 25 dias. Os indicadores e os resultados obtidos após a colheita de maçãs 'MaxiGala', em 2017 e 2018, para cada colheita, estão apresentados a seguir (Tabela 4).

Tabela 4 - Qualidade das maçãs 'MaxiGala' colhidas em 2017 e 2018 em relação às variáveis firmeza de polpa (FP), sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), relação entre SST/AT (*ratio*) e índice de iodo-amido (iodo-amido)

	Safra 2017	
	1ª colheita	2ª colheita
FP (N)	88,8* ± 11,7**	72,5 ± 8,0
SST (°Brix)	12,6 ± 0,7	14,5 ± 0,9
AT (% de AM)	0,485 ± 0,06	0,385 ± 0,05
SST/AT (<i>ratio</i>)	26,0	37,6
Iodo-amido (1-5)***	1,5 – 2,5	3,5 – 4,0
	Safra 2018	
	1ª colheita	2ª colheita
FP (N)	84,9 ± 8,7	74,2 ± 11,1
SST (°Brix)	10,3 ± 0,8	15,8 ± 0,9
AT (% de AM)	0,435 ± 0,04	0,482 ± 0,07
SST/AT (<i>ratio</i>)	23,7	32,8
Iodo-amido (1-5)	1,0 – 1,5	4,0 – 4,5

*Média obtida a partir de 3 repetições biológicas, sendo cada repetição biológica representada por 10 maçãs.

**desvio padrão

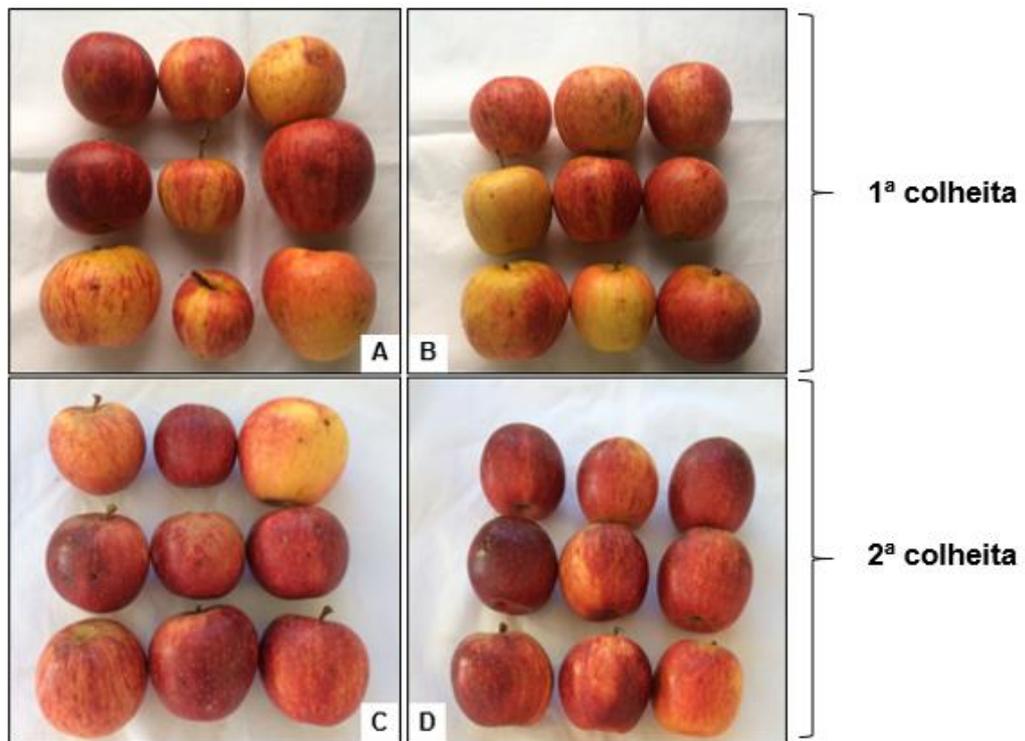
*** maior valor no teste iodo-amido não significa maior quantidade de amido

Como esperado, nas duas safras, as maçãs colhidas na chamada 1ª colheita apresentaram-se numa fase de maturação menos avançada, caracterizada por maior FP, menor teor de SST e menor índice de iodo-amido. Em contraste, as maçãs da 2ª colheita, tiveram menor FP, maior SST e maior índice de iodo-amido (Tabela 4). Esses resultados eram esperados, uma vez que a evolução da

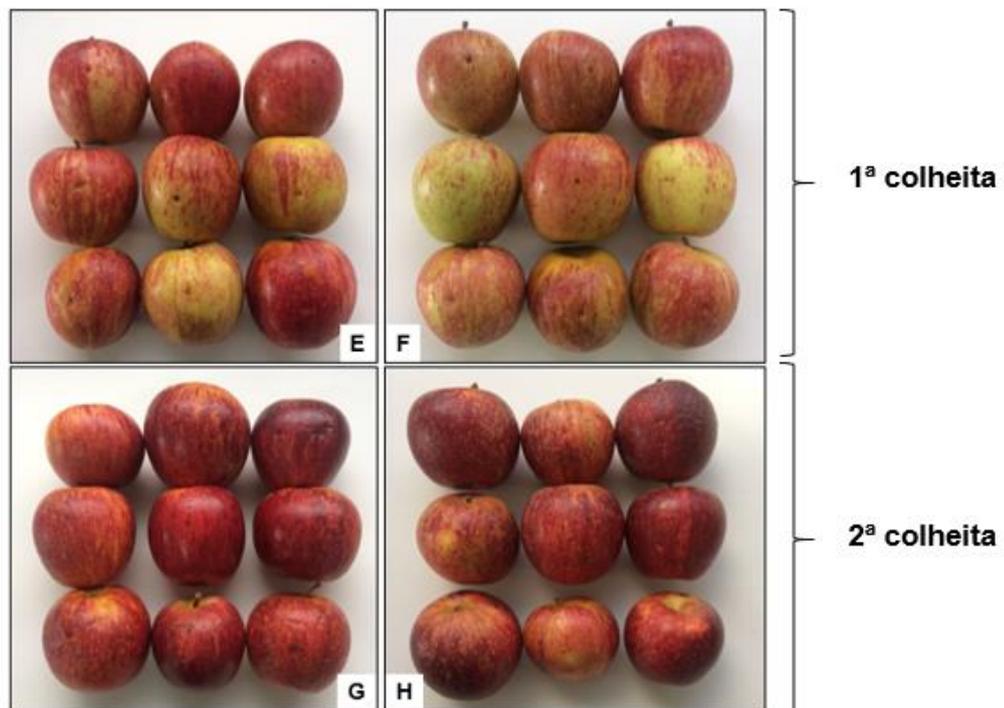
maturação é acompanhada da redução da FP, acúmulo de SST e redução do teor de amido, que é convertido em açúcares mais simples (GIRARDI, 2004; CHITARRA e CHITARRA, 2005). A única variável que não seguiu a regra geral foi a AT, em 2018. Em maçãs, é esperado que haja redução da AT com a evolução da maturação. Foi o que ocorreu em 2017 (Tabela 4) e em outros trabalhos com esse fruto (BENDER; LUNARDI, 2001; STANGER et al., 2013; GIRARDI et al., 2015). Em 2018, no entanto, isso não ocorreu. A causa exata desse comportamento não foi demonstrada nesse trabalho. Mesmo assim, o conjunto de resultados caracterizados no estádio de maturação são suficientes para demonstrar que, nas duas safras, teve-se maçãs com estádios de maturação distintos. Com isso, se pode dar continuidade aos estudos de inoculação com o fungo *N. brasiliensis*.

6.2 Maçãs inoculadas com fungo e com água estéril

A incubação permitiu confirmar que a lesão presente nas maçãs se tratava da podridão “olho-de-boi”. Além disso, cabe comentar que no grupo controle do experimento (maçãs com e sem 1-MCP inoculadas com água estéril, sem esporos de fungo) não foi constatado, após os 90 dias de armazenamento refrigerado sob AC, o desenvolvimento da podridão “olho-de-boi” (Figura 9 A-H). Isso permitiu concluir que a água utilizada no estudo era estéril, que as maçãs que representaram o grupo controle (400 maçãs/ano) não vieram do pomar colonizadas com podridão e que a desinfestação foi eficiente, por assegurar que nenhum outro tipo de fungo se desenvolvesse durante o armazenamento.



Maçãs colhidas em 2017



Maçãs colhidas em 2018

Figura 9 – Maçãs 'MaxiGala' feridas e inoculadas com água estéril na ausência (A, C, E, G) e na presença de 1-MCP (B, D, F, H), após 90 dias de armazenamento sob refrigeração e atmosfera controlada.

6.3 Incidência de podridão em função da aplicação de 1-MCP, antes e depois da inoculação

Para se testar a hipótese de que o momento da aplicação do 1-MCP poderia interferir na incidência da podridão “olho-de-boi”, a primeira ação foi testar a aplicação de 1-MCP, antes da inoculação com o fungo (Tabela 5). O teste realizado em duas safras, em dois pontos de colheita, indicou que as respostas (diâmetro da lesão e percentual de maçãs podres) foram dependentes das duas variáveis independentes. Cabe comentar que para realizar essa avaliação as variâncias dos resultados dos tratamentos com e sem 1-MCP dentro de uma mesma safra (2017 ou 2018) e ponto de colheita (1ª ou 2ª colheita) foram, primeiramente, comparadas pelo teste F ($\alpha = 0,05$) (Apêndice A). A partir disso, foi aplicado o teste t de Student ($\alpha = 0,05$) para variâncias homogêneas ou um teste t para variâncias não homogêneas (PIMENTEL-GOMES, 1978).

Em 2017, independente do ponto de colheita, o diâmetro de lesão e o percentual de frutos podres foi similar em frutos que receberam 1-MCP antes da inoculação daquelas que não receberam a aplicação. Já, em 2018, as respostas foram distintas. Para frutos colhidos menos maduros (1ª colheita), o maior diâmetro da lesão foi detectado em frutos sem aplicação de 1-MCP antes da inoculação. Para frutos mais maduros (2ª colheita), a resposta foi inversa: frutos que receberam a aplicação de 1-MCP apresentaram maior diâmetro de lesão. Em relação ao percentual de frutos podres, nenhuma diferença foi observada para maçãs colhidas menos maduras. Nos frutos colhidos mais maduros (2ª colheita) foi constatado um maior % de podridão em maçãs com 1-MCP antes da inoculação.

Tabela 5 – Incidência da podridão “olho-de-boi” em maçãs ‘MaxiGala’ colhidas em dois momentos (1ª e 2ª colheita), tratadas ou não com 1-MCP (tratamento realizado antes da inoculação com o fungo) e armazenadas em atmosfera controlada (0,5 °C, 90-95% umidade relativa e 0,6% de O₂ e 1,0% de CO₂) durante 90 dias

Safr	Tratamento	1ª colheita	
		Diâmetro da lesão (mm)	% de podres
2017	1-MCP	7,17* ns	44,5 ns
	Controle	7,27 ns	43,2 ns
2018	1-MCP	5,77 b	99,9‡ ns
	Controle	6,39 a	96,8 ns
Safr	Tratamento	2ª colheita	
		Diâmetro da lesão (mm)	% de podres
2017	1-MCP	7,86 ns	95,8 ns
	Controle	8,21 ns	94,1 ns
2018	1-MCP	6,55 a	86,4 a
	Controle	4,32 b	71,8 b

*média obtida a partir de 10 repetições biológicas, sendo cada repetição biológica representada por 10 maçãs. Teste *t* ($\alpha=0,05$), letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento e safra representam diferença estatística; não significativo (ns).

‡ variâncias não homogêneas.

Para o segundo teste, em que a aplicação do 1-MCP foi realizada depois da adição do inóculo (Tabela 6) foi constatado que essa ordem de tratamento com 1-MCP também foi dependente da safra e do ponto de colheita. Em 2017, independente do ponto de colheita, o diâmetro da lesão foi similar entre maçãs com e sem 1-MCP. O percentual de frutos podres, por sua vez, foi somente semelhante entre maçãs com e sem 1-MCP colhidas mais maduras (2ª colheita), pois para frutos menos maduros (1ª colheita) o percentual de frutos podres de maçãs tratadas com 1-MCP depois da adição do fungo foi menor do que de maçãs sem aplicação de 1-MCP. Em 2018, o diâmetro da lesão foi similar somente em frutos colhidos menos maduros. Maçãs tratadas com 1-MCP, da 2ª colheita, apresentaram maior diâmetro da lesão, do que aquelas que não foram tratadas com o inibidor de ET. O percentual de frutos podres foi semelhante entre maçãs com e sem 1-MCP, independente do ponto de colheita.

Tabela 6 – Incidência da podridão “olho-de-boi” em maçãs ‘MaxiGala’ colhidas em dois momentos (1ª e 2ª colheita), tratadas ou não com 1-MCP (tratamento realizado depois da inoculação com o fungo) e armazenadas em atmosfera controlada (0,5 °C, 90-95% umidade relativa e 0,6% de O₂ e 1,0% de CO₂) durante 90 dias

Safr	Tratamento	1ª colheita	
		Diâmetro da lesão (mm)	% de podres
2017	1-MCP	7,67* ns	33,6 b
	Controle	7,27 ns	43,2 a
2018	1-MCP	6,59 ns	99,9‡ ns
	Controle	6,39 ns	96,8 ns
Safr	Tratamento	2ª colheita	
		Diâmetro da lesão (mm)	% de podres
2017	1-MCP	8,47 ns	91,6‡ ns
	Controle	8,21 ns	94,1 ns
2018	1-MCP	7,12 a	91,6‡ ns
	Controle	4,32 b	71,8 ns

*média obtida a partir de 10 repetições biológicas, sendo cada repetição biológica representada por 10 maçãs. Teste *t* ($\alpha=0,05$), letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento e safr representam diferença estatística; ns não significativo (ns).

‡ variâncias não homogêneas

Ao comparar os resultados obtidos nas tabelas 5 e 6, ao que tudo indica, um menor diâmetro de lesão pode ser obtido em função da ordem de tratamento com 1-MCP. Na safr 2018/1ª colheita, enquanto maçãs tratadas com 1-MCP antes da inoculação apresentaram menor diâmetro de lesão do que frutos sem 1-MCP (Tabela 5), maçãs tratadas com ele depois da inoculação não apresentaram diferença de diâmetro de lesão daquelas não tratadas com 1-MCP (Tabela 6). Com relação ao percentual de frutos podres, foi o contrário, isto é, parece que a ordem de tratamento que contribui para um menor % de frutos podres foi a depois da inoculação com o fungo. Em 2017, maçãs menos maduras (1ª colheita) e tratadas com 1-MCP apresentaram menor % de frutos podres somente quando tratadas depois da inoculação (Tabela 6). Quando tratadas antes da inoculação (Tabela 5), maçãs com e sem 1-MCP, tiveram percentual de frutos podres similares. Embora em 2018/2ª colheita, maçãs tratadas com 1-MCP depois da inoculação não tenham apresentado diferença de maçãs sem 1-MCP para essa variável dependente (Tabela 6) – maçãs tratadas com ele antes da inoculação tiveram maior % de podridão do que aquelas não tratados para a mesma safr (2018) e ponto de colheita (2ª) (Tabela 5).

Para verificar se o que se sugeriu em relação a ordem de tratamento com 1-MCP, de fato, segue o raciocínio apresentado, analisaram-se os valores médios do

diâmetro da lesão e do percentual de frutos podres de maçãs tratadas com 1-MCP antes e depois da inoculação com a podridão “olho-de-boi” (Tabela 7).

Tabela 7 – Incidência da podridão “olho-de-boi” em maçãs ‘MaxiGala’ colhidas em dois momentos (1ª e 2ª colheita), tratadas com 1-MCP (antes e depois da inoculação com o fungo) e armazenadas em atmosfera controlada (0,5 °C, 90-95% umidade relativa e 0,6% de O₂ e 1,0% de CO₂) durante 90 dias

Safr	Ordem do tratamento com 1-MCP em relação ao fungo	1ª colheita	
		Diâmetro da lesão (mm)	% de podres
2017	1-MCP + inoculação	7,17* ns	44,5 a
	Inoculação + 1-MCP	7,67 [‡] ns	33,6 [‡] b
2018	1-MCP + inoculação	5,77 b	99,9 ns
	Inoculação + 1-MCP	6,59 a	99,9 [‡] ns
Safr		2ª colheita	
		Diâmetro da lesão (mm)	% de podres
2017	1-MCP + inoculação	7,86 b	95,8 a
	Inoculação + 1-MCP	8,47 [‡] a	91,6 [‡] b
2018	1-MCP + inoculação	6,55 ns	86,4 ns
	Inoculação + 1-MCP	7,12 ns	91,6 [‡] ns

*média obtida a partir de 10 repetições biológicas, sendo cada repetição biológica representada por 10 maçãs. Teste *t* (0,05), letras minúsculas diferentes para uma mesma safra e ponto de colheita representam diferença estatística; não significativo (ns).

[‡] variâncias não homogêneas.

De fato, ter aplicado o 1-MCP antes ou depois do fungo contribuiu de forma diferente sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento da podridão “olho-de-boi” em maçãs. Em metade das observações, quando aplicado antes da inoculação com o fungo, o 1-MCP colaborou para menores diâmetro de lesão, quando comparada a aplicação depois da inoculação com o fungo. Sobre o percentual de frutos podres, por sua vez, a ordem do 1-MCP que contribuiu para um menor % de podridão, em 50% das observações, foi a depois da inoculação e não antes (Tabela 7). Ao fazer um paralelo com maçãs sem 1-MCP, observou-se que o tratamento com 1-MCP antes da adição do inóculo contribuiu para um menor diâmetro de lesão em apenas uma observação (Tabela 5), o que representou 12,5% observações para essa variável dependente. Os mesmos 12,5% foram constatados ao comparar maçãs com 1-MCP depois da adição do inóculo e maçãs sem tratamento com o inibidor de ET (Tabela 6).

Os testes realizados nesse estudo em relação à ordem de tratamento com 1-MCP sugerem que essa questão parece ser um dos pontos que poderia explicar as divergências em relação ao comportamento da incidência da podridão *P. expansum* em maçãs avaliadas por outros autores (SAFTNER; ABBOTT; CONWAY, 2003;

JANISIEWICZ et al., 2003). Contudo, por se tratar de testes realizados apenas com duas safras, deve-se considerar os resultados obtidos nesses testes como dados preliminares, e não como um comportamento geral.

Diante do que foi apresentado, mesmo que tenham ocorrido discordâncias entre as ordens de tratamento com 1-MCP, considerou-se investigar a aplicação do 1-MCP depois da inoculação com o fungo (Tabela 6). Entende-se que essa forma é a que melhor representa uma situação real, visto que, cronologicamente, o fungo coloniza a maçã no campo, sendo, posteriormente, tratado com 1-MCP, quando já dentro da câmara de armazenamento. Logo, as abordagens feitas, a seguir, foram realizadas somente com essa ordem de tratamento.

6.4 Análise de variância dos tratamentos e comparação múltipla de médias

A seguir é apresentado o planejamento experimental (2^3) com oito tratamentos e suas combinações em termos de variáveis independentes (safra, ponto de colheita e presença do 1-MCP) e as respectivas respostas relacionadas à incidência da doença (diâmetro da lesão e percentual de frutos podres) (Tabela 8). Vale esclarecer que, diferentemente do item anterior (6.3), em que o teste *t* comparou as médias duas as duas, aqui foi feita uma análise estatística da variância (ANOVA) entre os tratamentos, considerando múltiplas médias.

Tabela 8 – Matriz do planejamento experimental com os valores codificados e variáveis independentes (safra, ponto de colheita e presença do 1-MCP) e variáveis dependentes (% de frutos podres e diâmetro da lesão)

Tratamentos	Valores codificadas			Variáveis independentes			Variáveis dependentes	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	Y _a	Y _b
1	1	1	1	2018	2 ^a	com	91,6 a	7,12 b,c
2	1	1	-1	2018	2 ^a	sem	71,8 b	4,32 d
3	-1	1	1	2017	2 ^a	com	91,6 a	8,47 a
4	-1	1	-1	2017	2 ^a	sem	94,1 a	8,21 a
5	1	-1	1	2018	1 ^a	com	99,9 a	6,59 c
6	1	-1	-1	2018	1 ^a	sem	96,8 a	6,39 c
7	-1	-1	1	2017	1 ^a	com	33,6 c	7,67 a,b
8	-1	-1	-1	2017	1 ^a	sem	43,2 c	7,27 b,c

X: variável independente e Y: variável dependente, X1: safra (2017 e 2018), X2: ponto de colheita (1^a e 2^a), X3: presença do 1-MCP (com ou sem).

Y_a: percentual de frutos podres (%), Y_b: diâmetro da lesão (mm).

Número de repetições biológicas: 10.

Teste Tukey ($\alpha = 0,05$), letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística.

Ao realizar uma decomposição de variâncias (Tabela 9), para verificar se houve ou não diferenças entre os tratamentos, viu-se que os dois valores de F calculado foram maiores do que os valores de F crítico, o que significa que a hipótese nula ($H_0 = \mu_1 = \mu_2$) foi rejeitada nos dois casos (ao nível de significância de 0,05). Isso significa que, a média de, pelo menos, um dos tratamentos diferiu dos demais.

Tabela 9 – ANOVA dos tratamentos (safra, ponto de colheita e presença do 1-MCP) sobre as variáveis dependentes percentual de frutos podres (Y_a) e diâmetro da lesão (Y_b)

	SQ		GL		F calculado	
	Y_a	Y_b	Y_a	Y_b	Y_a	Y_b
Tratamentos	46827,7	118,821	7	7	127,227	41,358
Erro	3785,8	29,551	72	72		
Total	50613,5	148,372	1	1		

SQ = soma dos quadrados, GL = graus de liberdade.

F crítico (7,72) = 2,126.

Com pelo teste ANOVA H_0 foi rejeitada, analisou-se, a seguir, os oito tratamentos (Tabela 8) por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) para verificar quais deles se diferenciaram em relação à incidência da doença e, ainda, constatar qual(is) proporcionou(aram) um menor percentual de maçãs podres e um menor diâmetro de lesão. Observou-se que os menores percentuais de frutos podres foram obtidos para os tratamentos 7 e 8, isto é, em 2017 para maçãs menos maduras (1ª colheita) foram obtidos os menores % de podridão (33,6% e 43,2%), independente da presença do 1-MCP (Tabela 8). O menor diâmetro da lesão (4,32 mm), por sua vez, foi constatado em 2018, para maçãs mais maduras (2ª colheita) e sem 1-MCP (tratamento 2) (Tabela 8).

Se comparada a análise estatística dos tratamentos pelo teste de Tukey (Tabela 8) e pelo teste t (Tabela 6) observa-se que, de uma forma geral, os testes concordaram entre si. Todavia, em relação a uma das observações, isto é, para o % de frutos, em 2017, para maçãs menos maduras (com 1-MCP: 33,6% e sem 1-MCP: 43,2%) os testes de Tukey e t divergiram. Nesse caso, acredita-se que ocorreu um erro tipo I no teste t , isto é, rejeitou-se a hipótese nula ($H_0 = \mu_1 = \mu_2$), sendo ela verdadeira, sendo esse erro corrigido pelo teste de Tukey (PIMENTEL-GOMES, 1978).

Sob uma análise geral, os testes apresentados até aqui não possibilitaram concluir nada em relação a hipótese. Por isso, para esclarecer as evidências desse estudo, a seguir, foi realizado um estudo que discutiu o papel (efeito) individual e interativo das variáveis independentes investigadas (safra, ponto de colheita e presença do 1-MCP).

6.5 Estudo dos efeitos safra, colheita, presença do 1-MCP e presença do fungo

A discussão anteriormente abordada (item 6.4) serviu, principalmente, para verificar que os tratamentos 7 e 8 tiveram os menores percentuais de frutos podres (< 44%) e que o tratamento 2 foi o que apresentou o menor diâmetro de lesão (< 5 mm). No obstante, em um experimento fatorial o efeito dos diversos fatores (variáveis independentes) sobre uma variável resposta deve ser analisado separadamente, conforme será discutido a seguir. Para tanto, foi necessário codificar as variáveis independentes, em valores codificados (-1 ou 1), conforme foi apresentado na tabela 8.

Para o % de podridão, o efeito do 1-MCP (variável independente) pode ser calculado pela diferença entre a resposta média (y_a) no nível superior (+) e a resposta média no nível inferior (-). Isso significa que o efeito do 1-MCP foi igual a $y_{a(+)} - y_{a(-)}$, onde $y_{a(+)}$ e $y_{a(-)}$ foram obtidos, respectivamente, a partir da média do % de podridão de maçãs com 1-MCP e sem 1-MCP da tabela 8 (com 1-MCP = 79,2% e sem 1-MCP = 76,5%). Portanto, o valor do efeito do 1-MCP foi de 2,7%, ou seja, a aplicação do 1-MCP após a inoculação do fungo aumentou em 2,7% o percentual de podridão em relação aos frutos sem 1-MCP (Figura 10 A). Os demais efeitos individuais e interativos foram calculados a partir das mesmas definições, estando os resultados resumidos a seguir (Figura 10 A,B).

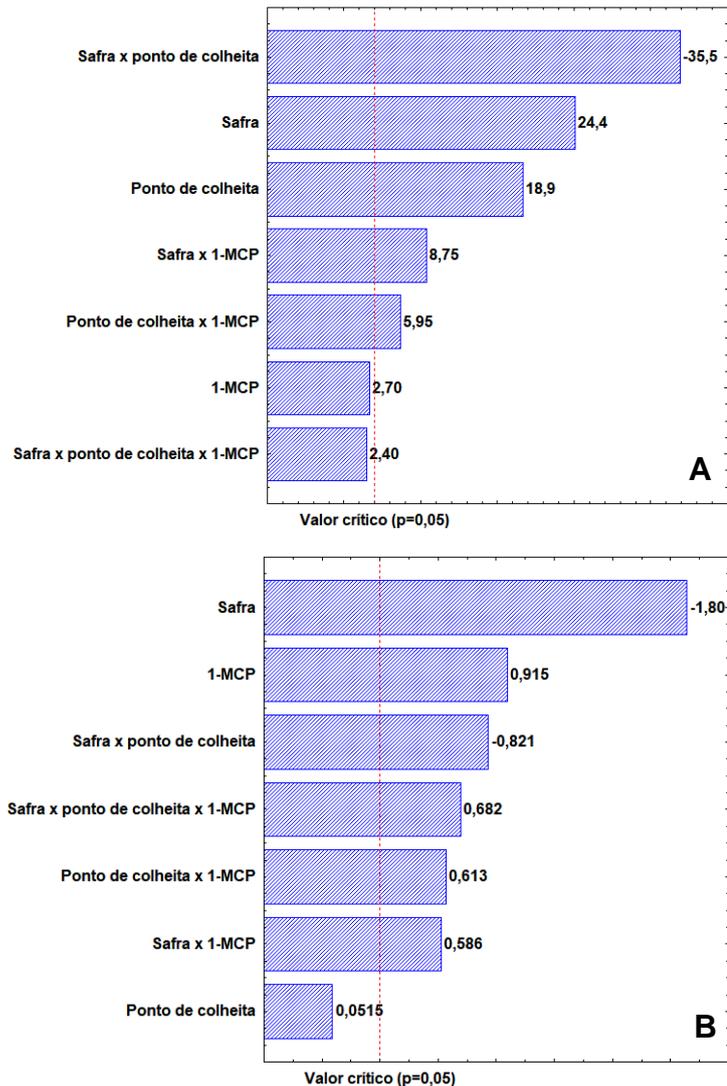


Figura 10 – Gráfico de pareto com os valores do efeito individual e interativo (safrax, ponto de colheita e presença do 1-MCP) sobre o percentual de frutos podres (A) e diâmetro da lesão (B). Linha pontilhada (--) representa o valor crítico ($p = 0,05$).

Para verificar se os efeitos apresentados (Figura 10 A,B) foram estatisticamente significativos calculou-se um valor crítico para cada efeito a partir do teste t ($t = \frac{x_1 - x_2}{\text{desvio padrão}/\sqrt{n}}$) (PIMENTEL-GOMES, 1978). No caso do % de frutos podres, o efeito isolado do 1-MCP foi avaliado em relação ao valor crítico ($0 + 1,621428 \times 1,997$) = 3,24, em que zero representa a igualdade de x_1 e x_2 ($x_1 = x_2 = 0$), 1,621428 representa $\frac{\text{desvio padrão}}{\sqrt{n}}$ e 1,997 representa o t crítico para 72 GL ao nível de 5% de significância. Diante disso, constatou-se que o efeito individual do 1-MCP depois da inoculação do fungo não foi significativo (valor absoluto do efeito, 2,70% < 3,24%, valor crítico), isto é, a presença do 1-MCP não contribuiu nem para um

maior, nem para um menor valor de % de frutos podres. Todavia, quando interagido com safra (1-MCP x safra) e ponto de colheita (1-MCP x ponto de colheita) sua presença foi significativa (valores absolutos > 3,24%, valor crítico) (Figura 10 A), o que significa que o 1-MCP tem efeito sobre o percentual de frutos podres, sendo esse dependente da safra e ponto de colheita.

Safra e ponto de colheita, na forma individual, apresentaram um efeito significativo sobre o percentual de frutos podres (valores absolutos > 3,24%, valor crítico) (Figura 10 A). Isso significou que safra 2018 ($y_{a (+)}$) teve 24,4% de podridão a mais do que a safra 2017 ($y_{a (-)}$) e que a 2ª colheita ($y_{a (+)}$) teve 18,9% de podridão a mais em relação à 1ª colheita ($y_{a (-)}$). Na forma interativa, safra e ponto de colheita também tiveram um efeito significativo, sendo esse o efeito mais relevante dentre todos (Figura 10 A). No gráfico 3D, fixando o 1-MCP em +1, é ilustrado, a seguir, a interação safra x ponto de colheita (Figura 11). Observa-se que os menores percentuais de frutos podres ocorreram na safra 2017 colhidos menos maduros (1ª colheita).

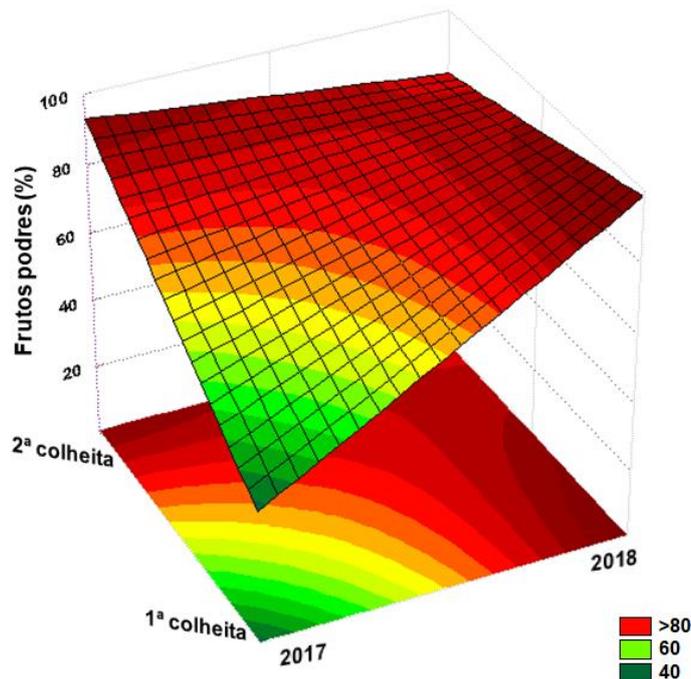


Figura 11 – Gráfico 3D que relaciona o perfil de percentual de frutos podres, safra e ponto de colheita. Região verde representa menor percentual de frutos podres e região vermelha representa maior percentual de frutos podres.

Para o diâmetro da lesão, o efeito individual do 1-MCP foi avaliado a partir do valor crítico 0,290 mm. Nesse caso, o efeito do 1-MCP foi o segundo mais pronunciado (valor absoluto do efeito, 0,915 mm > valor crítico). Para essa situação,

maçãs com 1-MCP apresentaram um diâmetro de lesão 0,9 mm maior do que maçãs sem 1-MCP. O efeito individual da presença do 1-MCP esteve atrás, apenas, do efeito individual safra, em que maçãs da safra 2017 tiveram um diâmetro de lesão 1,7 mm maior do que maçãs da safra 2018. Para essa variável resposta, o único fator que não teve influência foi o ponto de colheita (Figura 10 B). No gráfico 3D, fixando o 1-MCP em +1, é possível verificar que os menores diâmetros de lesão foram na safra 2018 em frutos colhidos menos maduros (1ª colheita) (Figura 12).

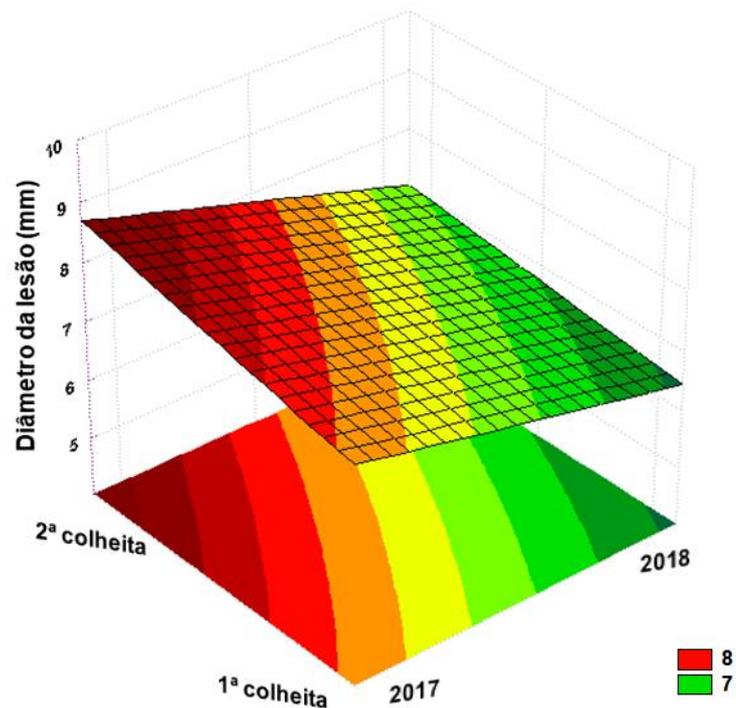


Figura 12 – Gráfico 3D que relaciona o perfil de diâmetro da lesão, safra e ponto de colheita. Região verde representa menor diâmetro da lesão e região vermelha representa maior diâmetro de lesão.

Para o amolecimento de polpa (Figura 13 A) o efeito individual do 1-MCP não foi significativo (valor absoluto do efeito, 0,733 N < valor crítico, 2,03). Por sua vez, quando interagiu com a safra o efeito do 1-MCP foi significativo (valor absoluto do efeito, 2,10 N > 2,03). Assim como a presença individual do 1-MCP não teve efeito sobre o amolecimento de polpa, a presença individual do fungo não apresentou efeito significativo (valor absoluto do efeito, 0,375 N < 2,03).

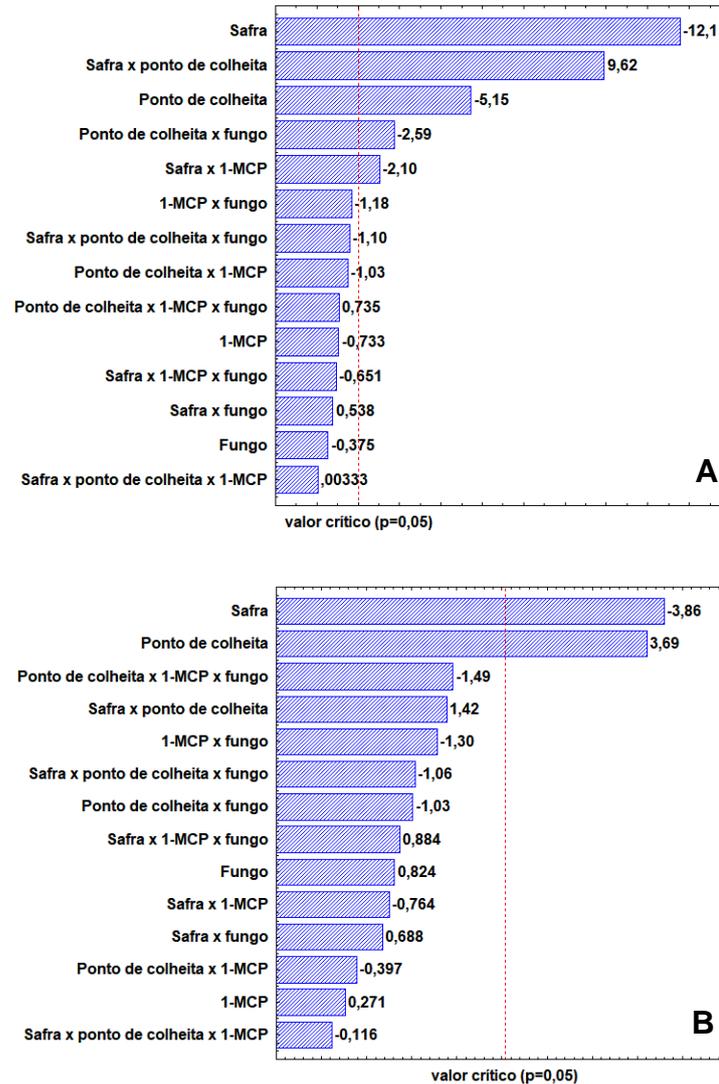


Figura 13 – Gráfico de pareto com os valores do efeito individual e interativo (safrá, ponto de colheita, presença do 1-MCP e presença do fungo) sobre o amolecimento de polpa (A) e sobre a relação entre sólidos solúveis totais e acidez titulável, *ratio* (B). Linha pontilhada (--) representa o valor crítico ($p = 0,05$).

Contudo, dentre todos os efeitos, o efeito mais proeminente sobre o amolecimento de polpa foi o efeito individual da safrá (valor absoluto do efeito, 12,1 mm > 2,03) (Figura 13 A); isto é, a safrá 2017 apresentou um valor médio de amolecimento de polpa (cerca de 20 N) maior do que a safrá 2018 (cerca de 8 N) (Figura 14).

Para a relação entre SST e AT (*ratio*) verificou-se que os únicos efeitos significativos foram da safrá (valor absoluto do efeito, 3,85 > 2,03) e da colheita (valor absoluto do efeito, 3,69 > 2,03) (Figura 13 B), sendo a safrá 2018 3,85 mais doce e menos ácida do que a safrá 2017, e a segunda colheita 3,69 mais doce e menos ácida do que a primeira colheita (Apêndice B).

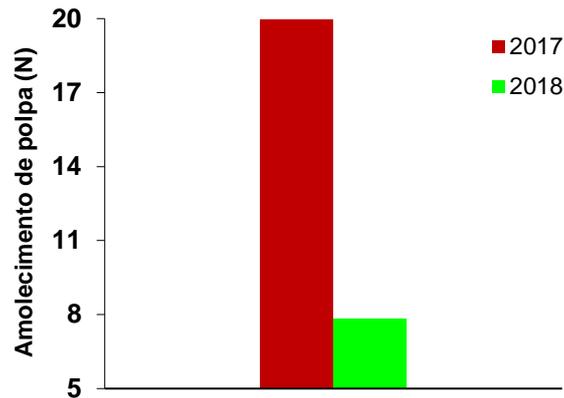


Figura 14 – Valor médio do amolecimento de polpa das maçãs ‘MaxiGala’ nas safras 2017 e 2018.

A partir do estudo dos efeitos sobre a incidência da doença e sobre a qualidade do fruto, não é possível afirmar que o 1-MCP é responsável por uma maior ou menor incidência de podridão ou maior ou menor qualidade do fruto. O 1-MCP teve efeito, majoritariamente, quando interagido com safra e/ou ponto de colheita, o que significa que safra e ponto de colheita interferem nas respostas à aplicação do 1-MCP.

Considerando que sobre todas as variáveis dependentes (% de frutos podres, diâmetro da lesão, amolecimento de polpa e *ratio*) os efeitos da safra e ponto de colheita estiveram sempre entre os mais proeminentes, entende-se que, provavelmente, alguns dos fatores edafoclimáticos, como clima, temperatura, luminosidade, chuva, precipitação de chuva e granizo e outros possam ter tido influência sobre o comportamento dessas variáveis. Na literatura, é descrito que na fase de desenvolvimento vegetativo-reprodutivo, estiagens prolongadas, precipitações de granizo, pluviosidade em excesso são prejudiciais, visto que, além de diminuir a quantidade do que se produz, podem causar lesões na epiderme, reduzir o tamanho ou aumentar a incidência de podridões nos frutos (HOFMANN; NACHTIGALL, 2004; FIORAVANÇO; CZERMAINSKI; ALVES, 2012). No caso da podridão “olho-de-boi”, pluviosidade aparece entre um dos principais pontos que contribuem para a dispersão e disseminação dos esporos no pomar, visto que chuvas frequentes interferem na proteção química do fruto (SANHUEZA et al., 2006).

6.6 Correlação das variáveis independentes e dependentes

Também, fez-se uma análise de correlação linear que fornece, através do coeficiente de correlação linear de Pearson (r), um valor que representa a intensidade e forma de correlação (positiva ou negativa) entre duas variáveis (Tabela 10).

O fator safra teve correlação linear ao nível de significância de 0,05 com as quatro variáveis dependentes % de frutos podres, diâmetro da lesão, amolecimento de polpa e *ratio* (Tabela 10). Houve correlação negativa com diâmetro da lesão (-0,73) e amolecimento de polpa (-0,70). Isso significa que os frutos da safra 2017 tiveram um diâmetro de lesão e um amolecimento de polpa maior do que os da safra 2018. Além de ter tido correlação linear com a safra, o amolecimento de polpa teve correlação linear negativa (-0,41) com o ponto de colheita e com o % de frutos podres (-0,92). Nesse último caso, isso quer dizer que as maçãs com menor percentual de frutos podres foram as que tiveram maior amolecimento de polpa. Um bom exemplo dessa situação foi o que aconteceu para o % de frutos podres de maçãs com 1-MCP (33,4%) e sem 1-MCP (43,2%), na safra 2017 e 1ª colheita (Figura 11), em que se constatou os maiores amolecimentos de polpa (entre 26 e 29 N) (Apêndice C). Embora não se fez estudos adicionais para buscar um porquê para isso, o que se sabe é que, dependendo da literatura, esses resultados contradizem ou não o que foi verificado por outros autores. Por exemplo, quando comparado aos trabalhos de Cantu et al. (2008) e Alkan e Fortes (2015), em que é descrito que o amolecimento de polpa favorece a ocorrência de podridões, os resultados obtidos no estudo contradizem. Por sua vez, quando comparado com o trabalho de Akagi e Stoz (2007) não, pois, nesse caso, os autores evidenciaram que não há relação entre firmeza de polpa e podridão.

Tabela 10 – Correlação de Pearson dentre e entre as variáveis independentes (safra, ponto de colheita, presença do 1-MCP e presença do fungo) e variáveis dependentes (percentual de frutos podres, diâmetro da lesão, amolecimento de polpa e relação entre sólidos solúveis totais (SST)/acidez titulável (AT), *ratio*)

		Variáveis independentes				Variáveis dependentes			
		1	2	3	4	5	6	7	8
Variáveis independentes	Safra (1)	1,0							
	Ponto de colheita (2)	0,0	1,0						
	1-MCP (3)	- 0,0	-0,0	1,0					
	Fungo (4)	-0,21	0,21	0,21	1,0				
Variáveis dependentes	Percentual de frutos podres (5)	0,50*	0,39	0,06	**	1,0			
	Diâmetro da lesão (6)	- 0,73*	-0,02	0,37	-	0,01	1,0		
	Amolecimento de polpa (7)	- 0,70*	-0,41*	-0,08	0,24	-0,92*	0,26	1,0	
	<i>Ratio</i> (8)	0,43*	0,37	-0,06	0,37	0,19	0,16	0,17	1,0

* a correlação significativa no nível de significância de 0,05.

** a variável independente presença do fungo (com e sem) não foi correlacionada linearmente com as variáveis dependentes % de frutos podres e diâmetro de lesão por não ter sido uma variável investigada em relação a essas variáveis respostas.

6.7 Estudo do perfil de acúmulo relativo de transcritos

O perfil de acúmulo relativo de transcritos apresentados a seguir foi realizado conforme esquematizado na figura 8, do item 5.5.6.4 (materiais e métodos). Primeiramente, buscou-se analisar os seguintes aspectos *i)* em que momento os genes alvo tiveram maior e menor acúmulo de transcritos, isto é, no início (10 dias) ou no fim do armazenamento (90 dias); e, *ii)* se entre as variáveis independentes (safra, ponto de colheita, bem como a presença do 1-MCP, fungo e ferida) houveram contrastes em relação ao acúmulo de transcritos.

Vale ressaltar que maçãs sem 1-MCP (controle) e sem fermento e sem inoculação, após 10 e 90 dias de armazenamento, foram utilizadas como amostras calibradoras no experimento, sendo, portanto, o perfil de acúmulo dos transcritos de cada tratamento obtido em relação a essas amostras (Figura 15 A,B,C,D).

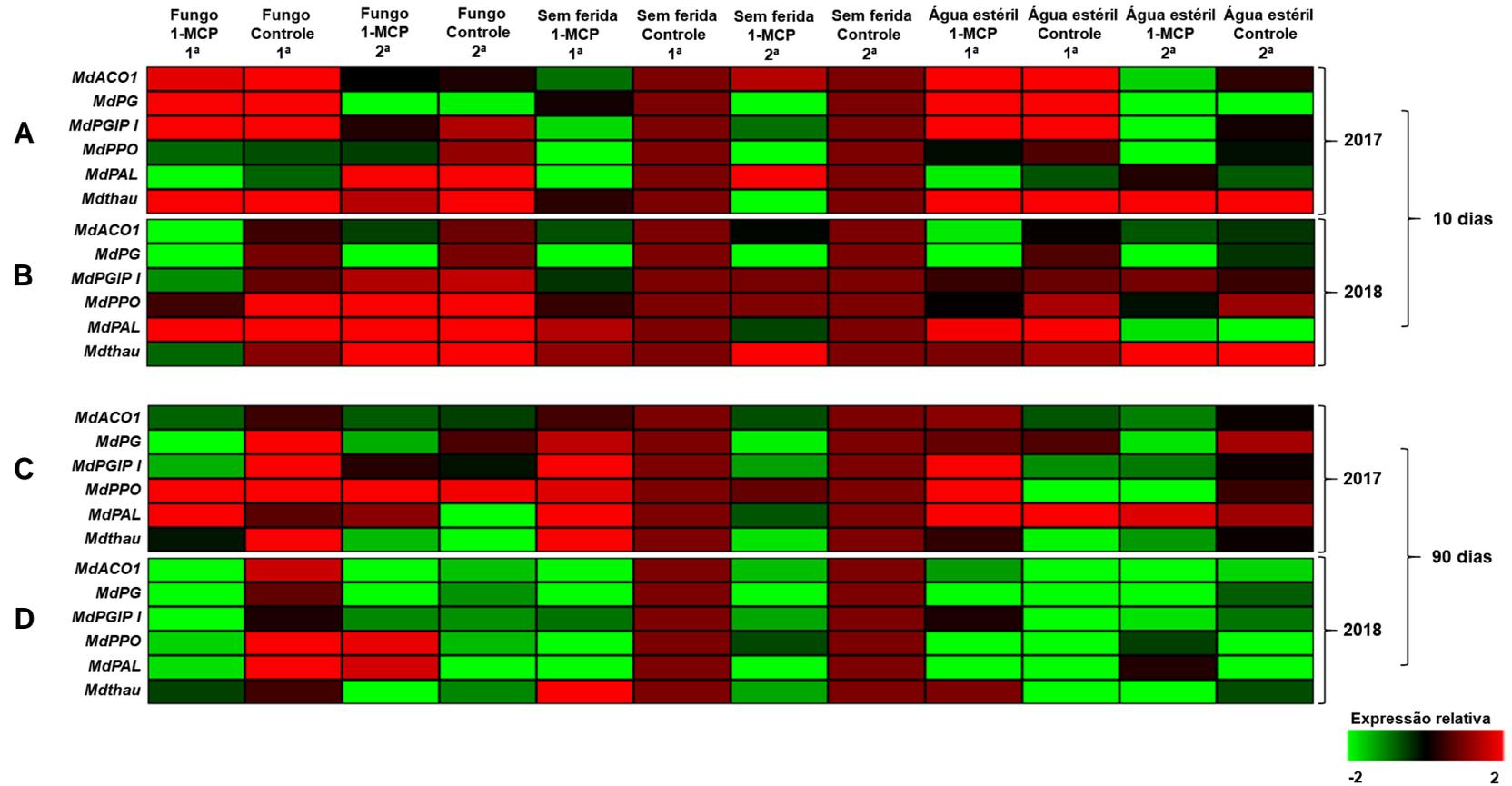


Figura 15 – Perfil de acúmulo dos transcritos envolvidos em resposta as safras (2017 e 2018), ponto de colheita (1ª e 2ª), presença do 1-MCP, do fungo e ferida para maçãs refrigeradas sob atmosfera controlada por 10 dias (A e B) e por 90 dias (C e D), representados por escala que varia de -2 a 2. A extremidade da escala representada pela cor verde clara indica menor acúmulo de transcritos do gene e a extremidade representada pela cor vermelha clara indica maior acúmulo de transcritos do gene.

Sob um panorama geral, o perfil de acúmulo relativo de transcritos foi maior no início do armazenamento (Figura 15 A,B). Além disso, verificou-se que houve contrastes entre tratamentos com e sem 1-MCP, com e sem fungo, com e sem ferida entre as colheitas e, ainda, entre as safras (Figura 15 A,B,C,D). De uma forma geral, o tratamento com 1-MCP inibiu a transcrição/acúmulo de transcritos dos genes em algumas situações, como, por exemplo, se comparado os tratamentos com e sem 1-MCP, da safra 2017 (Figura 15 C) e com e sem 1-MCP, da safra 2018 (Figura 15 D).

Com exceção de alguns casos verificados para a safra 2017/1ª colheita, na presença do 1-MCP houve um menor acúmulo de transcritos dos genes *MdACO1*, *MdPG* e *MdPGIP I*. Além disso, diferenças entre o perfil de acúmulo relativo desses transcritos parecem ter ocorrido em função da safra e do ponto de colheita, e não da presença do fungo (Figuras 15 A,B,C,D).

Após 10 dias de armazenamento, o acúmulo relativo dos transcritos *MdPPO* e *MdPAL* foi maior na safra 2018, do que na safra 2017 (Figura 15 A,B), enquanto no final do armazenamento (após 90 dias) foi ao contrário, isto é, a safra 2017 foi a que apresentou maior acúmulo (Figura 15 C,D).

Dentre todos os transcritos, *Mdthau* apresentou um perfil de acúmulo relativo de transcritos consideravelmente diferente em 10 e 90 dias de armazenamento (Figura 15 A,B,C,D), isto é, enquanto no início do armazenamento houve um maior acúmulo de transcritos (Figura 15 A,B), no fim, houve um menor acúmulo de transcritos (Figura 15 C,D).

A investigação da ferida foi realizada para constatar se um determinado perfil de transcritos foi desencadeado pelo ferimento manual feito no fruto, anteriormente à inoculação. Essa ideia surgiu em função do que foi abordado por Su e colaboradores (2011) que, dentre suas conclusões, discutiram que as reações de defesa no hospedeiro parecem ter sido uma resposta ao ferimento manual feito nas maçãs. A partir do que foi investigado verificou-se um maior acúmulo de transcritos em maçãs sem ferida, após 10 dias de armazenamento para a safra 2018 (Figura 15 B), e para maçãs sem ferida após 90 dias de armazenamento, para a safra 2017/1ª colheita (Figura 15 C). Para esses casos, isso pode ser um indicativo de que o perfil de acúmulo de transcritos obtidos tenha sido desencadeado por causa da ferida ou presença do 1-MCP.

Uma discussão mais detalhada da relação entre o perfil de acúmulo dos transcritos e variáveis independentes (safra, colheita, presença do 1-MCP e fungo)

sobre as variáveis dependentes (amolecimento de polpa, % de frutos podres e diâmetro da lesão), estão nos tópicos a seguir.

6.8 *MdACO1*, *MdPG* e *MdPGIP I* e sua relação com as variáveis independentes sobre o amolecimento de polpa

Estudos citam que frutos mais amolecidos, por estarem mais maduros, são mais suscetíveis ao desenvolvimento de patógenos (CANTU et al., 2008; ALKAN e FORTES, 2015). Esse raciocínio parte da ideia de que a barreira à invasão, representada pela parede celular, está mais frágil quando o fruto está mais maduro. Nesse sentido, para um fruto estar mais amadurecido e, conseqüentemente, menos firme, deve ter havido maior atividade de enzimas degradantes de parede celular. Independente da firmeza de polpa do fruto, os fungos também secretam enzimas capazes de solubilizar a parede celular do fruto. Quando isso acontece, uma das formas de barrar esse processo é através da síntese de proteínas PGIPs, as quais são capazes de diminuir/impedir a atividade de enzimas PG secretadas pelo fungo (GREGORI et al., 2008; FERRARI et al., 2012; HOU et al., 2014). Ressalta-se que PGIPs são capazes de inibir apenas a ação de enzimas PG sintetizadas por fungos, e não aquelas dos frutos (CANTU et al., 2008).

A *priori* frutos tratados com 1-MCP, que têm a ação do ET inibida, preservam melhor a firmeza de polpa, e, com isso, acabam sendo menos suscetíveis à colonização por fungos. Contudo, vale ressaltar que essa ideia não pode ser encarada como via de regra, uma vez que um estudo com peras tratadas com 1-MCP evidenciou que o que mais contribuiu para a suscetibilidade à *B. cinerea* foi enzimas PG secretadas por esse fungo, e não uma maior ou menor firmeza de polpa do fruto (AKAGI e STOZ, 2007).

Considerando que o fitohormônio ET é sintetizado a partir de uma reação que envolve a enzima ACO (TAIZ e ZEIGER, 2017), quando o transcrito *MdACO* apresentar um maior acúmulo é esperado que o nível de transcritos *MdPG* e *MdPGIP I* também apresente incremento. Esse raciocínio parte da ideia de que o fitohormônio ET é responsável por participar, tanto da síntese de enzimas degradantes de parede celular, quanto de reações envolvidas na proteção do fruto contra fitopatógenos, como a partir da síntese de PGIPs (ALKAN e FORTES, 2015; TAIZ e ZEIGER, 2017).

Ao fazer uma comparação entre o perfil de acúmulo de transcritos dos genes *MdACO1*, *MdPG* e *MdPGIP* com o perfil de amolecimento de polpa, ficou evidenciado que os tratamentos com os maiores amolecimentos de polpa (entre 25 e 29 N) (região de cor vermelha clara do diagrama de cores, Figura 16) tiveram um maior acúmulo de transcritos desses genes, enquanto que os tratamentos com os menores amolecimentos de polpa (entre 4 e 7 N) (região de cor verde clara, Figura 16) apresentaram um menor acúmulo de transcritos.

Especificamente sobre a presença e a ausência do 1-MCP, ao que parece, esse inibidor de ação de ET preveniu o amolecimento de polpa e a expressão dos genes, exceto em 2017/1ª colheita (Figura 16). Além disso, com o aumento do período de armazenamento, os genes deixaram de serem transcritos, uma vez que de 10 para 90 dias, de uma forma geral, esses passaram a apresentaram um menor acúmulo de transcritos (região verde do diagrama de cores, Figura 16).

Além da presença do 1-MCP, as variáveis intrínsecas safra e ponto de colheita colaboraram sobre o perfil de acúmulo de transcritos dos genes e sobre o amolecimento de polpa, visto que os maiores acúmulo de transcritos dos genes *MdACO1*, *MdPG* e *MdPGIP* e maiores amolecimentos de polpa foram constatados, exclusivamente, para os tratamentos da safra 2017 e 1ª colheita (Figura 16). Isso corrobora o que foi discutido no item 6.5, onde se evidenciou que o que mais teve efeito sobre o amolecimento de polpa foram as variáveis safra e ponto de colheita.

Quando comparada à presença do 1-MCP e ao efeito da interação safra e ponto de colheita, ao que parece, a presença do fungo não apresentou um papel proeminente sobre o perfil de comportamento do acúmulo de transcritos dos genes, bem como sobre o amolecimento de polpa. De uma maneira geral, ao comparar os tratamentos na presença e na ausência do fungo (Figura 16), dentro de cada variável dependente (acúmulo de transcritos e amolecimento de polpa) o perfil de resposta foi similar. Destaque para o perfil de acúmulo de transcritos do gene *MdPGIP I*, em que se observou um maior acúmulo de transcritos também sobre a ausência do fungo. Como anteriormente mencionado, esse transcrito costuma apresentar um maior acúmulo somente quando na presença do fungo e não sobre outra situação. Dessa maneira, cogita-se as seguintes hipóteses *i)* de que o fungo *N. brasiliensis*, responsável pela podridão “olho-de-boi”, estava presente, no modo quiescente, nos frutos tratados com água estéril e *ii)* que esse fungo ou algum outro

estavam presentes na planta que cultivou esses frutos, ou, ainda, em plantas vizinhas à ela. Para este último caso, vale destacar que plantas se comunicam entre si e, portanto, nada impede que tenham ocorrido sinalizações entre essas e, por consequência, entre essas e o fruto.

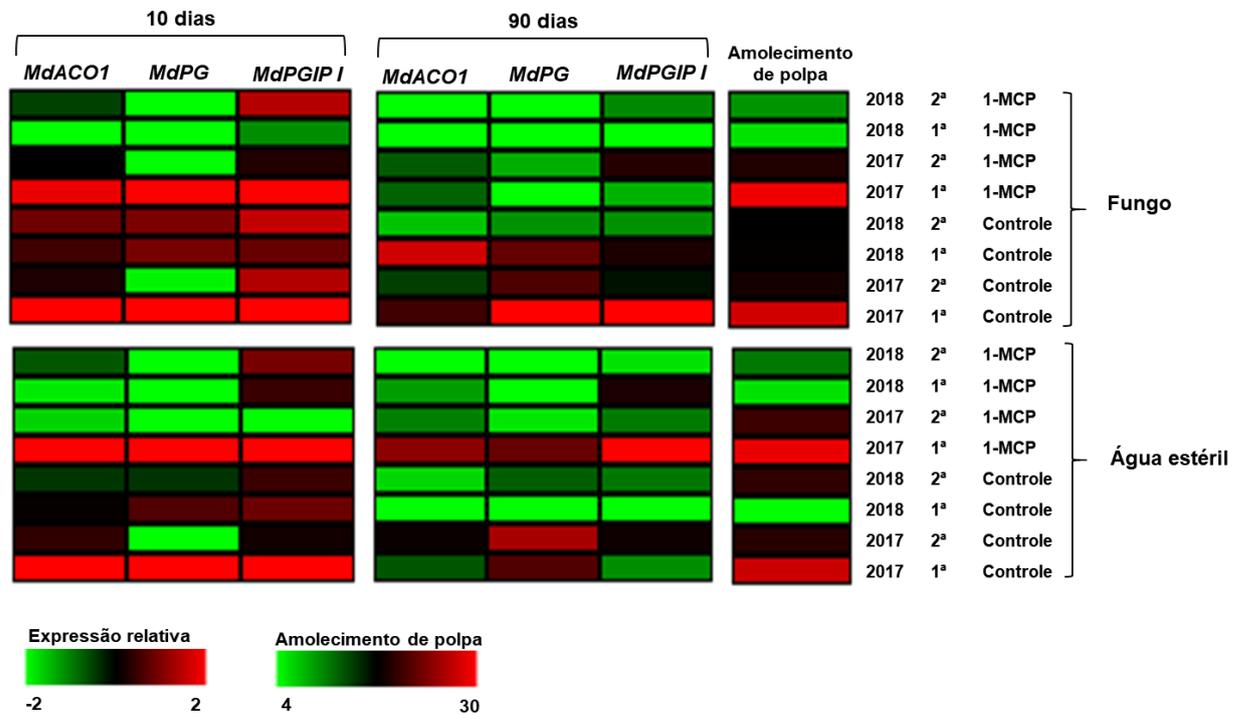


Figura 16 - Perfil de acúmulo dos transcritos e de amolecimento de polpa, envolvidos em resposta à safra (2017 e 2018), ponto de colheita (1ª e 2ª), presença do 1-MCP, presença do fungo em maçãs refrigeradas sob atmosfera controlada por 10 ou 90 dias, representados por escalas que variaram de - 2 a 2 (acúmulo de transcritos) e de 4 a 30 (amolecimento de polpa). A extremidade da escala representada pela cor verde clara indica menor acúmulo de transcritos do gene ou menor amolecimento de polpa, e a extremidade representada pela cor vermelha clara indica o oposto.

6.9 *MdPPO*, *MdPAL* e *Mdthau* e sua relação com as variáveis independentes sobre a incidência da doença

Uma maior ou menor incidência de podridão num fruto é vinculado à atividade de enzimas responsáveis por dificultar a colonização de patógenos no hospedeiro. Para exemplificar isso, o aumento da atividade das enzimas PAL (JIANG; JOYCE; TERRY, 2001; LIU et al., 2005; ZHANG et al., 2012), PPO (LIU et al., 2005; ZHANG et al., 2012), assim como maior acúmulo de mRNA de *PAL* (MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005) são evidenciados como importantes para proporcionar uma menor incidência de podridões em frutos.

Em suma, a enzima PAL catalisa a formação de diversos CF com características antimicrobianas (quinona, fitoalexinas e lignina), enquanto a enzima PPO acelera a reação entre uma dessas substâncias tóxicas (quinona) a uma fração proteica do fungo com o intuito de intoxicá-lo (TAIZ e ZEIGER, 2017). Além dessas enzimas, algumas famílias de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) são vinculadas com a indução de respostas relacionadas à patogênese. Dentre as principais PR-proteínas associadas à defesa diante de um estresse biótico a PR-5 tem demonstrado atividade antifúngica *in vitro* em milho (ROBERTS e SELITRENNIKO, 1990), folhas de tabaco (KOIWA et al., 1997) e limão (KIM et al., 2009). A família PR-5 é representada por uma família de proteínas que compartilham homologia com a taumatina e, portanto, chamada de proteínas semelhantes à taumatina (*thaumatin-like*) (SUDISHA et al., 2012).

Um maior acúmulo de transcritos dos genes *MdPAL*, *MdPPO* e *Mdthau* é esperado na presença do fungo, considerando que o produto dos três genes atua no combate à invasão de fitopatógenos. Contudo, é importante ressaltar que as enzimas PAL e PPO, bem como a proteína PR-5, são dependentes da ação do ET (GUEST e BROWN, 1997; PORAT et al., 1999; JIANG et al., 2001; MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005; BLANCO-ULATE et al., 2013), que, por sua vez, é inibido por 1-MCP (WATKINS, 2006). Na prática, pelos resultados obtidos nesse projeto se observou que a presença do 1-MCP não parece ter influenciado *MdPAL* e *MdPPO*, e sim a presença do fungo, pois maçãs com e sem 1-MCP apresentaram um perfil de acúmulo de transcritos similares, diferentemente do que foi obtido para maçãs com fungo e água estéril. Quando um desses genes teve um maior ou menor acúmulo de transcritos, geralmente, o outro gene também apresentou o mesmo comportamento para o mesmo tratamento e período de armazenamento (Figura 17). Isso sugere que há relação entre as enzimas PAL e PPO, de modo que, possivelmente, a partir da síntese de CF por PAL, a enzima PPO foi utilizada para oxidar tais compostos (TAIZ e ZEIGER, 2017).

Fazendo um paralelo com o perfil de incidência da doença, observou-se que para o menor percentual de frutos podres (região de cor verde clara no diagrama de cores para essa variável dependente) um maior acúmulo de transcritos de ambos os genes (*MdPPO* e *MdPAL*) foi obtido. Para o menor diâmetro da lesão (região de cor clara também), no entanto, foi constatado um menor acúmulo de expressão de *MdPPO* e *MdPAL* (Figura 17). É possível que o aparecimento da podridão

(analisada pelo % de frutos podres) e a velocidade com que o fungo colonize o fruto (investigado através do diâmetro da lesão) demandem o desencadeamento de um arsenal de reações em proporções distintas, o que faz com que essas duas variáveis dependentes apresentem, portanto, sensibilidade distintas em relação a *MdPPO* e *MdPAL*. Também, pode ser observado que a ferida pode ter sido responsável por um *start* no desencadeamento do acúmulo dos transcritos *MdPPO* e *MdPAL*, considerando que maçãs sem ferida apresentaram, para alguns tratamentos, um maior acúmulo de transcritos *MdPPO* e *MdPAL*. Todavia, considera-se isso menos provável do que a primeira hipótese (que a presença do fungo foi o que mais contribuiu para o acúmulo dos transcritos *MdPPO* e *MdPAL*), visto que maçãs com água estéril também foram feridas manualmente e, nem por isso, tiveram um maior acúmulo de transcritos para *MdPPO* e *MdPAL* (Figura 17).

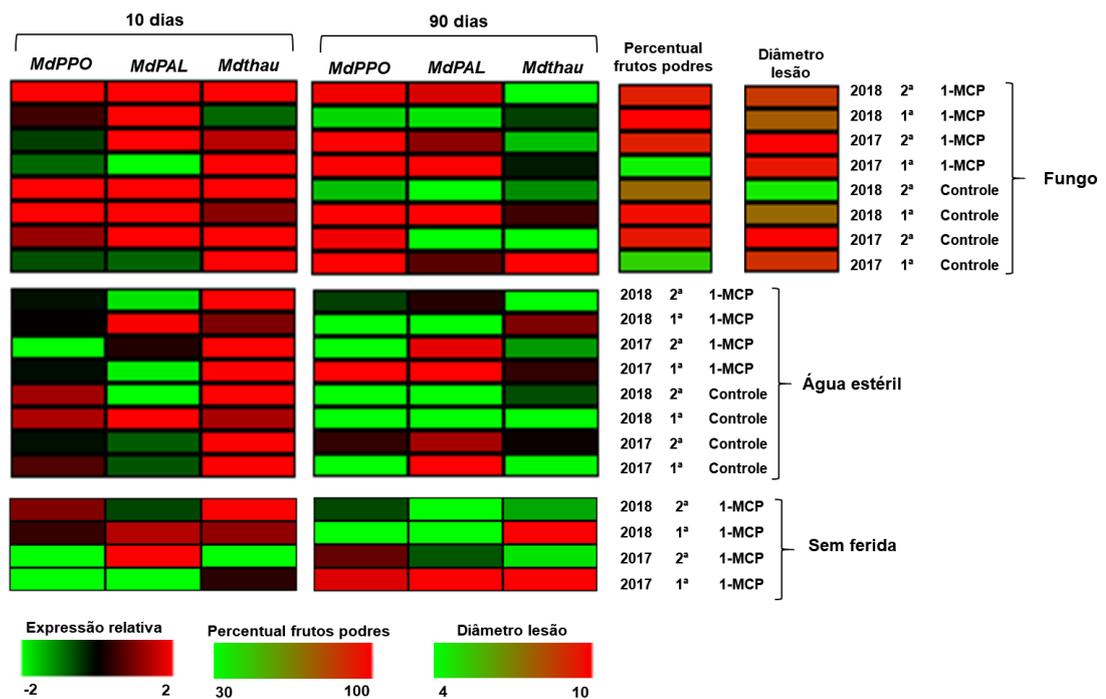


Figura 17 - Perfil de acúmulo dos transcritos, percentual de frutos podres (%) e diâmetro da lesão (mm) envolvidos em resposta à safra (2017 e 2018), ponto de colheita (1ª e 2ª), presença do 1-MCP, fungo e ferida em maçãs refrigeradas sob atmosfera controlada por 10 ou 90 dias, representados por escalas que variam de -2 a 2 (acúmulo dos transcritos), de 30 a 100 (percentual de frutos podres) e de 4 a 10 (diâmetro da lesão). A extremidade da escala representada pela cor verde clara indica menor acúmulo de transcritos do gene, ou menor % de frutos podres e diâmetro da lesão, e a extremidade representada pela cor vermelha clara indica o oposto.

Considerando que o maior acúmulo de transcritos de *MdPPO* e *MdPAL* ocorreu, majoritariamente, na safra 2017 (Figura 17) – é possível que o efeito da

safra tenha sido o mais importante sobre o perfil de *MdPPO* e *MdPAL*. Nesse sentido, isso iria ao encontro do que foi discutido no item 6.5, isto é, que a safra teve um dos efeitos mais proeminentes sobre a incidência da podridão “olho-de-boi”. Um último ponto a ser abordado sobre esses dois genes é que, provavelmente, *MdPPO* e *MdPAL* foram sinalizadas por ET durante o período de armazenamento, uma vez que *MdACO* apresentou, geralmente, um maior acúmulo de transcritos para os mesmos tratamentos que *MdPPO* e *MdPAL*. A exemplo disso, quando foi constatado um menor percentual de frutos podres (2017/1ª colheita) foi verificado um maior acúmulo dos transcritos *MdACO*, *MdPPO* e *MdPAL* (Figuras 16 e 17).

Após 10 dias de armazenamento, maçãs na presença e na ausência de fungo e 1-MCP apresentaram o mesmo perfil de acúmulo de transcritos para *Mdthau* (Figura 17), independente da safra e do ponto de colheita. Na literatura, é descrito que as proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) podem estar presentes em níveis baixos antes de alguma infecção, indicando, assim, que elas podem ter uma função mais ampla do que apenas resposta associada à resistência a doenças (GUEST e BROWN, 1997). Com relação ao menor acúmulo de transcritos no fim do armazenamento (Figura 17), é possível que isso tenha ocorrido em detrimento do tempo em que as maçãs permaneceram sob refrigeração e AC ($O_2 = 0,6\%$ e $CO_2 = 1,0\%$), de modo que o avanço do período de armazenamento contribuiu para a repressão do acúmulo de *Mdthau*, ou que, em 90 dias, a ativação de *Mdthau* não foi mais necessária, uma vez que o produto proteico produzido em 10 dias foi suficiente para ativar respostas vinculadas ao efetor responsável.

7. Considerações finais

- ✓ De um modo geral, a análise estatística dos tratamentos pelo teste *t* e pelo teste de Tukey concordaram. Houve, para uma única observação, divergência entre os dois testes que, como sugerido, no teste *t* ocorreu um erro tipo I, que acabou sendo corrigido pelo teste de Tukey.
- ✓ Quando comparada a adição do 1-MCP antes *versus* depois da adição do inóculo, a aplicação do 1-MCP contribuiu de forma diferente sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento da podridão “olho-de-boi” em maçãs. Maçãs tratadas com 1-MCP antes da adição do inóculo tiveram menores diâmetro de lesão na metade das observações, enquanto aquelas tratadas com 1-MCP depois da adição do inóculo apresentaram menores percentuais de frutos podres, para o mesmo número de observações.
- ✓ O estudo dos efeitos das variáveis independentes (safra, ponto de colheita e presença do 1-MCP) sobre a incidência da doença comprovou que o 1-MCP teve efeito individual apenas sobre o diâmetro da lesão, em que maçãs tratadas com 1-MCP depois da adição do inóculo tiveram, em média, 1 mm a menos do que maçãs sem o inibidor de ação do ET. Sobre o percentual de frutos podres, safra x ponto de colheita, foram as que apresentaram o efeito mais proeminente, o que sugere que essas variáveis podem contribuir para um viés do efeito do 1-MCP sobre a variável resposta percentual de frutos podres.
- ✓ O tratamento com 1-MCP depois da adição do inóculo não teve efeito sobre o amolecimento de polpa e *ratio*. Por outro lado, safra e colheita, bem como sua interação tiveram, sendo que em 2017/1^a colheita foram obtidos os frutos com maior amolecimento de polpa, enquanto em 2017/2^a colheita foram constatados os frutos mais doces e menos ácidos.
- ✓ Além da safra ter sido um dos efeitos mais pronunciados sobre a suscetibilidade à podridão “olho-de-boi”, essa variável foi a única que apresentou correlação linear com todas as variáveis dependentes avaliadas (diâmetro da lesão, percentual de frutos podres, amolecimento de polpa e *ratio*).

- ✓ Além da correlação linear com a safra, o amolecimento de polpa teve correlação negativa com o percentual de frutos podres, o que significa que maçãs com menor percentual de frutos podres foram as que apresentaram maior amolecimento de polpa, não seguindo, portanto, o que alguns trabalhos da literatura sugerem em relação à combinação desses fatores.
- ✓ As maçãs que apresentaram um maior acúmulo de transcritos de *MdACO*, *MdPG*, *MdPGIP* foram as que apresentaram um maior amolecimento de polpa. As variáveis intrínsecas (safra e ponto de colheita) foram as que mais contribuíram sobre a perda de firmeza de polpa.
- ✓ O maior acúmulo de transcritos de *MdPPO* e *MdPAL* teve relação com a podridão “olho-de-boi”. Além disso, é provável que a variável intrínseca safra tenha contribuído sobre o perfil de transcritos desses genes.
- ✓ O maior acúmulo de transcritos de *Mdthau*, no início do armazenamento, não parece ter relação com a podridão “olho-de-boi” na maçã, e sim com algum efator desencadeado previamente ao armazenamento. É possível que o avanço do período de armazenamento tenha contribuído para a repressão do acúmulo de *Mdthau*, ou que, em 90 dias, a ativação de *Mdthau* não tenha sido mais necessária, considerando que o produto proteico produzido no início do armazenamento tenha sido suficiente na ativação de respostas desencadeadas pelo efator responsável.
- ✓ O experimento com duas safras não confirma, nem nega a hipótese geral de que a aplicação de 1-MCP (antes ou depois da inoculação) interferem na ocorrência da podridão “olho-de-boi”.

Referências

- ADKINS, M.; HOFMAN, P. J.; STUBBINGS, B. A.; MACNISH, A. J. Manipulating avocado fruit ripening with 1-methylcyclopropene. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, p. 33–42, 2005.
- AGAPOMI. Produção de maçãs no RS safra 2017/2018. Disponível em: < <http://agapomi.com.br/wp-content/uploads/2019/05/safra-2018-1.pdf> >. Acesso em 11 junho 2019.
- AGRAPAR. AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Outros/SmartFreh.pdf>. Acesso em: 09 março 2019.
- AGUILAR, C. G.; MAZZOLA, M.; XIAO, C. L. Timing of apple fruit infection by *Neofabraea perennans* and *Neofabraea kienholzii* in relation to bull's-eye rot development in stored apple fruit. **Plant Disease**, v. 101, n.5, p. 800–806, 2017.
- AKAGI, A.; STOTZ, H. U. Effects of pathogen poligalacturonase, ethylene, and firmness on interactions between pear fruits and *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 91, n. 10, p. 1337–1344, 2007.
- ALKAN, N.; FORTES, A. M. Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to postharvest fungal pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–14, 2015.
- AMAGAI, A.; MAEDA, Y. The ethylene action in the development of cellular slime molds: an analogy to higher plants. **Protoplasma**, v. 167, p. 159–168, 1992.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245–5250, 2004.
- ARAÚJO, L.; MEDEIROS, H. A.; PASA, M. S.; SILVA, F. N. Doenças da macieira e da pereira. **Informe agropecuário**, v. 37, p. 61–74, 2016.
- ARGENTA, L. C.; FAN, X. T.; MATTHEIS, J. P. Influence of 1-methylcyclopropene on ripening, storage life, and volatile production by d'Anjou cv. pear fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3858–3864, 2003.
- ARGENTA, L.C.; VIEIRA, M.J.; SCOLARO, A.M.T. Validação de catálogos de cores como indicadores do estágio de maturação e do ponto de colheita de maçã. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 23, p. 71–77, 2010.
- BARTNICKI, V. A.; SANHUEZA, R. M. V.; DO AMARANTE, C. V. T.; CASTRO, L. A. S.; RIZZATTI, M. R.; SOUZA, J. A. V. Água aquecida e radiação UV-C no controle pós-colheita de *Cryptosporiopsis perennans* em maçãs. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 45, p. 124–131, 2010.

- BARTNICKI, V. A.; SANHUEZA, R. M. V.; DO AMARANTE, C. V. T.; STEFFENS, C. A. Tratamentos hidrotérmicos e com radiação UV-C no controle pós-colheita da podridão olho-de-boi em uma linha comercial de seleção de maçãs. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 737–745, 2011.
- BENDER, R. J.; LUNARDI, R. Perdas qualitativas de maçãs cv. Gala em armazenamento refrigerado. **Revista brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 563–567, 2001.
- BLANCO-ULATE, B.; VINCENTI, E.; POWELL, A. L. T.; CANTU, D. Tomato transcriptome and mutant analyses suggest a role for plants stress hormones in the interaction between fruit and *Botrytis cinerea*. **Frontiers in Plant Science**, v. 142, p. 1–16, 2013.
- BLANKENSHIP, S. M.; DOLE, J. M. 1-Methylcyclopropene: a review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 28, p.1–25, 2003.
- BOGO, A.; COMPARIN, C. C.; SANHUEZA, R. M. S.; RITSCHER, P.; CASA, R. T.; SILVA, F. N.; EVERHART, S. E. Characterization of *Neofabraea actinidiae* and *N. brasiliensis* as causal agents of apple bull's-eye rot in southern Brazil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 40, p. 229–237, 2018.
- BOTH, V.; BRACKMANN, A.; THEWES, F. R.; FERREIRA, D. F.; WAGNER, R. Effect of storage under extremely low oxygen on the volatile composition of 'Royal Gala' apples. **Food Chemistry**, v. 156, p. 50–57, 2014.
- BRACKMANN, A.; DE FREITAS, S. T.; DE MELLO, A. M.; STEFFENS, C. A. Aplicação de 1-MCP em caqui 'Quioto' armazenado sob refrigeração em atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 42–44, 2003.
- BRACKMANN, Auri. Armazenamento em atmosfera controlada. In: GIRARDI, Cesar Luís (Org.). **Maçã pós-colheita**. 1ª ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 67–95.
- BRACKMANN, A. Uso da atmosfera controlada é recente no Brasil. **Visão Agrícola**, n. 7, p. 50–52, 2007.
- BRACKMANN, A.; CERETTA, M.; DAL'COL LÚCIO, A.; PINTO, J. A. V.; ANESE, R. O. Tolerância da maçã 'Fuji' a baixas temperaturas durante o armazenamento em atmosfera controlada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1489–1496, 2011.
- BROETTO, F.; GOMES, E. R.; JOCA, T. A. C. **O estresse das plantas [recurso eletrônico]: teoria & prática**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2017, 194 p.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: John Wiley & Sons, 2000, 1367 p.
- CAMELDI, I.; NERI, F.; CEREDI, G.; MUZZI, E. Influence of harvest date on bull's eye rot of 'Cripps Pink' apples and control chemical strategies. **Plant Disease**, v. 100, p. 2287–2293, 2016.

CANTU, D.; VICENTE, A. R.; GREVE, L. C.; DEWEY, F. M.; BENNETT, A. B.; LABAVITCH, J. M.; POWELL, A. L. T. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 105, p. 859–64, 2008.

CHAGUÉ, V. Ethylene production by fungi: biological questions and future developments towards a sustainable polymers industry. In: TIMMIS, Kenneth N. (Org.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Heidelberg: Springer, 2010. p. 3011–3020.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 783 p.

COMPARIN, Carla Cassol. **VARIABILIDADE E DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Cryptosporiosis* spp., ASSOCIADOS À PODRIDÃO “OLHO-DEBOI” EM MAÇÃS NA REGIÃO SUL DO BRASIL**. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2009.

CRISTESCU, S. M.; MARTINIS, D.; LINTEL HEKKERT, S.; PARKER, D. H.; HARREN, F. J. M. Ethylene production by *Botrytis cinerea* *in vitro* and in tomatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5342–5350, 2002.

CROUS, P. W. Fungal Planet description sheets: 371-399. **Persoonia Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, p. 264–267, 2015.

CUNNINGTON, J. H. Three *Neofabraea* species on pome fruit in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 33, p. 453–454, 2004.

DAL CIN, V., RIZZINI, F. M.; BOTTON, A.; TONUTTI, P. The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 42, p. 125–133, 2006.

DEFILIPPI, B. G.; DANDEKAR, A. M.; KADER, A. A. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5694–5701, 2004.

DO AMARANTE, C. V. T.; ARGENTA, L. C.; VIEIRA, M. J.; STEFFENS, C. A. Alteração da eficiência do 1-MCP com o retardo na sua aplicação após a colheita em maçãs ‘Fuji Suprema’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 984–992, 2010.

DONG, L.; LURIE, S.; ZHOU, H., Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of ‘Canino’ apricots and ‘Royal Zee’ plums. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, p. 135–145, 2002.

EBRAHIM, S.; USHA, K.; SINGH, B. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism, In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.). **Science Against Microbial**

Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, Badajoz: Formatex Research Center, 2011. p. 1043–1054.

EMBRAPA (2018). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/busca-de-noticias/-/noticia/32185915/podridao-olho-de-boi-das-macas-e-tema-de-workshop-em-vacaria-rs>>. Acesso em 17 março 2019.

E.P.A. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_PC-224459_30-May-08.pdf>. Acesso em 30 abril 2017.

FAN, X.; MATTHEIS, J. P. Impact of 1-methylcyclopropene and methyl jasmonate on apple volatile production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2847–2853, 1999.

FAN, X.; MATTHEIS, J. P. 1-Methylcyclopropene and storage temperature influence responses of ‘Gala’ apple fruit to gamma irradiation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 23, p. 143–151, 2001.

FERRARI, S.; SELLA, L.; JANNI, M.; LORENZO, G.; FAVARON, F.; D’OVIDIO, R. Transgenic expression of polygalacturonase-inhibiting proteins in *Arabidopsis* and wheat increases resistance to the flower pathogen *Fusarium graminearum*. **Plant Biology**, v. 14, p. 31–38, 2012.

FERRARI, S.; SAVATIN, D. V.; SICILIA, F.; GRAMEGNA, G.; CERVONE, F.; LORENZO, G. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1–9, 2013.

Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT). Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Countries - Select All; Regions - World + (Total); Elements - Production Quantity; Items - Apples; Years - 2017 + 2016. Acesso em: 06 março 2019.

FIORAVANÇO, J. C.; CZERMAINSKI, A. B. C.; ALVES, S. A. M. **Condições meteorológicas e sua influência na safra de maçã de 2011/12 em Vacaria, RS** (Comunicado Técnico 123). Bento Gonçalves: Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho - Embrapa Uva e Vinho, 2012. 8 p.

FIORAVANÇO, J. C.; SANTOS, R. S. S. dos. **Maçã: o produtor pergunta, a Embrapa responde** Brasília: Embrapa, 2013. 239 p.

FUJIMOTO, S.Y., OHTA, M., USUI, A., SHINSHI, H., OHME-TAKAGI, M. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. **Plant Cell**, v. 12. p. 393-404, 2000.

FUKUDA H.; FUJII, T.; OGAWA, T. Preparation of a cell-free ethylene forming system from *Penicillium digitatum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, p. 977–981, 1986.

FUKUDA, H.; OGAWA, Y.; TAZAKI, M.; NAGAHAMA, K.; FUJII, T.; TANASE, S.; MORINO, Y. Two reactions are simultaneously catalyzed by a single enzyme: the arginine dependent simultaneous formation of two products, ethylene and succinate, from 2-oxoglutarate by an enzyme from *Pseudomonas syringae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 188, p. 483–489, 1992.

GIRARDI, César Luís; SANHUEZA, Rosa Maria V.; BENDER, Renar João. Manejo pós-colheita e rastreabilidade na produção integrada de maçãs (Circular Técnica 31). Bento Gonçalves: Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho - Embrapa Uva e Vinho, 2002. 24 p.

GIRARDI, César Luís. **Maçã: pós-colheita**. 1ª ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 109 p.

GIRARDI, César Luís, BRACKMANN, Auri, PARUSSOLO, Aguinaldo. Colheita e Armazenamento. In: NACHTIGALL, Gilmar Ribeiro (Org). **Maçã Produção**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília/Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 148–154.

GIRARDI, César Luís; PEGORARO, Camila; CRIZEL, Gisele Rodrigues; STORCH, Tatiane Timm; ZANUS, Mauro Celso. **Conservação da qualidade pós-colheita de maçãs** (Circular Técnica 114). Bento Gonçalves: Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho - Embrapa Uva e Vinho, 2015. 16 p.

GONÇALVES, Breno Xavier. **Ação do etileno no acúmulo diferencial de proteínas durante o amadurecimento de frutas de maçãs, cv. Gala, clone Baigent**. 2016. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

GOULAO, L.; OLIVEIRA, C. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 4–25, 2008.

GOLDING, J. B.; SHEARER, D.; WYLLIE, S. G.; MCGLASSON, W. B. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.14, p. 87–98, 1998.

GREGORI, R.; MARI, M.; BERTOLINI, P.; BARAJAS, J. S.; TIAN, J.; LABAVITCH, J. Reduction of *Colletotrichum acutatum* infection by a polygalacturonase inhibitor protein extracted from apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 309–313, 2008.

GUEST D.; BROWN, J. Plant defences against pathogens. In: Brown J. F., Ogle, H. J., Plant Pathology Society, Australasian Plant Pathology Society (Org.). **Plant pathogens and plant diseases**. Austrália: Rockvale Publications for the Division of Botany, School of Rural Science and Natural Resources, University of New England, 1997, p. 242-262.

HARKER, F. R.; GUNSON, A.; JAEGER, S. R. The case for fruit quality: an interpretive review of consumer attitudes, and preferences for apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, p. 351–357, 2003.

HARRIS, D.R; SEBERRY, J. A.; WILLS, R. B. H; SPOHR, L.J. Effect of fruit maturity on efficiency of 1-methylcyclopropene to delay the ripening of bananas. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 303–308, 2000.

HENRIQUEZ, J. L. First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. **Plant Disease**, v. 89, p. 1360–1360, 2005.

HO, Q. T.; VERBOVEN, P.; VERLINDEN, B. E.; SCHENK, A.; NICOLAÏ, B. M. Controlled atmosphere storage may lead to local ATP deficiency in apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 78, p. 103–112, 2013.

HOFMAN, P. J.; JOBIN-DECOR, M.; MEIBURG, G. F.; MACNISH, A. J.; JOYCE, D. C. Ripening and quality responses of avocado, custard apple, mango and papaya fruit to 1-methylcyclopropene. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, p. 567–572, 2001.

HOFFMANN, A.; NACHTIGALL, G. R. Fatores edafoclimáticos. In: NACHTIGALL, Gilmar Ribeiro (Org). *Maçã Produção*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília/Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 25-31.

HORTOVA, B.; NOVOTNY, D.; ERBAN, T. Physiological characteristics and pathogenicity of eight *Neofabraea* isolates from apples in Czechia. **European Journal of Horticultural Science**, v. 79, p. 327–334, 2014.

HOU, W.; MU, J.; LI, A.; WANG, H.; KONG, L. Identification of a wheat polygalacturonase-inhibiting protein involved in *Fusarium* head blight resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 731–745., 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4ª Ed., 1ª Ed. Digital. São Paulo, 2008

JANISIEWICZ, W. J.; LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S; SAFTNER, R. A.; REED A. N.; CAMP, M. J. Control of bitter rot and blue mold of apples by integrating heat and antagonist treatments on 1-MCP treated fruit stored under controlled atmosphere conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, p. 129–143, 2003.

JEONG, J.; HUBER, D. J.; SARGENT, S. A. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 241–364, 2002.

JIA, Y.; KAKUTA, Y.; SUGAWARA, M.; IGARASHI, T.; OKI, N.; KISAKI, M.; SHOJI, T.; KANETUNA Y., HORITA, T.; MATSUI, H.; HONMA, M. Synthesis and degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by *Penicillium citrinum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, p. 542–549, 1999.

JIANG, Y. M.; JOYCE, D. C.; TERRY, L. A. 1-Methylcyclopropene treatment effects strawberry fruit decay. **Postharvest Biology and Technology**, v. 23, p. 227–232, 2001.

KARS, I.; MCCALMAN, M.; WAGEMAKERS, L.; VAN KAN, J. A. L. Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methyltransferase genes by PCR-based targeted mutagenesis: Bcpme1 and Bcpme2 are dispensable for virulence of strain B05.10. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, p. 641–652, 2005.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008. 455 p.

KIM, B. G.; FUKUMOTO, T.; TATANO, S.; GOMI, K.; OHTANI, K.; TADA, Y.; AKIMITSU, K. Molecular cloning and characterization of a thaumatin-like protein-encoding cDNA from rough lemon. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, p. 3–10, 2009.

KIST, B. B. et al. **Anuário Brasileiro da Maçã 2015**. Santa Cruz: Gazeta Santa Cruz, 2015. 72 p.

KIST, B. B. et al. **Anuário Brasileiro da Maçã 2017**. Santa Cruz: Gazeta Santa Cruz, 2016. 56 p.

KIST, B. B. et al. **Anuário Brasileiro da Maçã 2018**. Santa Cruz: Gazeta Santa Cruz, 2018. 56 p.

KOIWA, H.; KATO, H.; NAKATSU, T.; ODA, J.; YAMADA, Y.; SATO, F. Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. **Plant Cell Physiology**, v. 38, p. 783–791, 1997.

LI, T., TAN, D., YANG, X., WANG, A. Exploring the apple genome reveals six ACC synthase genes expressed during fruit ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 157, p. 119-123, 2013.

LI, J.; LEU, H.; SONG, H.; LAI, T.; XU, X.; SHI, X. 1-methylcyclopropene (1-MCP) suppressed postharvest blue mold of apple fruit by inhibiting the growth of *Penicillium expansum*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 125, p. 59–64, 2017.

LIU, H. X., JIANG, W. B., ZHOU, L. G., WANG, B. G., LUO, Y. B. The effects of 1-methylcyclopropene on peach fruit (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) ripening and disease resistance. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 40, p. 1–7, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LORENZO, G.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 313–335, 2001.

MARCOS J. F.; GONZALEZ-CANDELAS, L.; ZACARIAS, L. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p.2183–2193, 2005.

MATTHEIS, J. P.; FAN, X. T.; ARGENTA, L. C. Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4510–4516, 2005.

McMURCHIE, E. J.; MCGLASSON, W. B.; EAKS, I. L. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. **Nature**, v. 237, p. 235–236, 1972.

MAXIN, P.; WEBER, R. W. S. Control of *Phacidiopycnis washingtonensis* storage rot of apples by hot-water treatments without the ethylene inhibitor 1-MCP. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 118, p. 222–224, 2011.

MICHAŁECKA, M.; BRYK, H.; PONIATOWSKA, A.; PULAWSKA, J. Identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot of apple in Poland and their direct detection in apple fruit using multiplex PCR. **Plant Pathology**, v. 65, p. 643–654, 2016.

MIR, N. A.; BEAUDRY, R. M. Use of 1 MCP to reduce the requirement for refrigeration and modified-atmospheres in the storage of apple fruit. In.: INTERNATIONAL CONFERENCE ON POSTHARVEST SCIENCE, 2000. Anais..., Jerusalem, Israel, ISHS/ARO, 2000, p. 23.

MONDINO, Pedro, et al. **Manual de identificação de doenças da maçã em pós-colheita**. Montevideo: CYTED, 2009. 67 p.

NACHTIGAL, J. C.; KLUGE, R. A.; FACHINELLO, J. C.; BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPel, 2002. 163p.

NUNES, C. C. e ALVES, S. A. M. **Prejuízos pós-colheita em macieira: um alerta para as doenças de verão**. Vacaria: Informações - Artigos da Agapomi, 2015. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1007659/1/1011.pdf>>. Acesso em: 03 ago 2017.

PEŠICOVÁ, K.; KOLAŘÍK, M.; HORTOVÁ, B.; NOVOTNÝ, D. Diversity and identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot in the Czech Republic. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, p. 683–693, 2017.

PANG, X.-M.; NADA, K.; LIU, J. -H.; KITASHIBA, H.; HONDA, C.; YAMASHITA, H.; TATSUKI, M.; MORIGUCHI, T. Interrelationship between polyamine and ethylene in 1-methylcyclopropene treated apple fruits after harvest. **Physiologia Plantarum**, v. 128, p. 351–359, 2006.

PAUL, V., PANDEY, R., SRIVASTAVA, G. C. The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene — An overview. **Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p. 1-21, 2012.

PAZOUT, J.; PAZOUTOVA, S. Ethylene is synthesized by vegetative mycelium in surface cultures of *Penicillium-cyclopium* westling. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 384–387, 1989.

PETRI, J. L. Formação de flores, polinização e fertilização. In: **A cultura da macieira**. Florianópolis: GCM/ EPAGRI, 2006. p. 229–260.

PETRIACQ, P.; LÓPEZ, A.; LUNA, E. Fruit Decay to Diseases: Can Induced Resistance and Priming Help? **Plants**, v. 7, p. 77–93, 2018.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002–2007, 2001.

PIMENTEL-GOMES, F. **Estatística Experimental**. 1ª Ed. Buenos Aires: Editorial Hemisfério Sul SA, 1978. 324 p.

PORAT, R.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOREN, R.; DROBY, S. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the post-harvest qualities of ‘Shamouti’ oranges. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, p. 155–163, 1999.

PRIMROSE, S. B.; DILWORTH, M. J. Ethylene production by bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 93, p. 177–181, 1976.

RABOBANK 2018. Disponível em <https://research.rabobank.com/far/en/sectors/regional-food-agri/world_fruit_map_2018.html> Acesso em: 08 março 2019.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: **Rapid Cycle Real-Time PCR** Meuer, S., Wittwer C., Nakagawara, K. (Org.). Rapid cycle real-time PCR, methods and applications. Springer Press, Heidelberg, 2001. p. 21–34.

REVISTA BRASILEIRA DE FRUTICULTURA. Disponível em <<http://rbf.org.br/rs-vacaria-vai-sediar-1o-workshop-sobre-podridao-olho-de-boi-das-macas-destaca-embrapa/>> Acesso em: 28 jun 2019

ROBERTS, W. K., SELITRENNIKO, C. P. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 1771–1778, 1990.

RODRIGUES, J. D.; ONO, E. O. Grandes culturas: café. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, v. 30, p. 32–34, 2001.

RUPASINGHE, H. P. V.; MURR, D. P.; PALIYATH, G.; SKOG, L. Inhibitory effect of 1-MCP on ripening and superficial scald development in ‘McIntosh’ and ‘Delicious’ apples. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 75, p. 271–276, 2000.

SAEED, A. I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**, v. 34, p. 374–378, 2003.

SAFTNER, R. A.; ABBOUT, J. A.; CONWAY, W. S. Effects of 1-methylcyclopropene and heat treatments on ripening and postharvest decay in ‘Golden Delicious’ apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, p. 120–127, 2003.

SANHUEZA, R. M. V. **Podridão de frutos e cancos dos ramos causados por *Cryptosporiopsis perennans* nas macieiras** (circular técnica 29). Bento Gonçalves: Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho - Embrapa Uva e Vinho, 2001. 8 p.

SANHUEZA, R. M. V. Podridões de maçãs frigorificadas. In: KOVALESKI, Adalécio (Org.). **Maçã fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p.35-44.

SANHUEZA, R. M. V.; MAFFIOLETTI, M. A.; COMPARIM, C. C.; KRASNIAK, J.; BOGO, A.; ARCARI, R. **Características e controle da podridão “olho de boi” nas maçãs do Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho - Embrapa Uva e Vinho, 2006. 13 p.

SANHUEZA, R. M. V.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E. M. Controle do inóculo inicial para redução dos danos pela podridão ‘olho-de-boi’ em macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1044–1054, 2010.

SANHUEZA, R. M. V.; BARTNICKI, V. A.; CAMPOS, A. D.; RIZZATI, M. R. In: NACHTIGALL G. R. (Org). **Caracterização e controle das doenças de maçãs em pós-colheita**. Bento Gonçalves: Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho - Embrapa Uva e Vinho, 2011. p. 107-136.

SANHUEZA, Rosa Maria Valdebenito. Resistência de patógenos da macieira no Brasil – situação atual. In: Seminário sobre resistência de patógenos da Macieira aos fungicidas - conceitos, mecanismos e detecção, 2013, Vacaria. **Anais...** Bento Gonçalves: Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho - Embrapa Uva e Vinho, 2013. p.1-7.

SANHUEZA, Rosa Maria Valbenito. **Doenças de verão das maçãs e as características do ciclo de 2015**. Vacaria: Informações - Artigos da Agapomi, 2015. Disponível em: <http://agapomi.com.br/wp-content/uploads/Doen%C3%A7as-de-ver%C3%A3o-MA%C3%87%C3%83S-RMVS_-AGAPOMI-23_12-2.pdf>. Acesso em: 30 abril 2017.

SISLER, E. C.; BLANKENSHIP, S. M. Methods of counteracting an ethylene response in plants, U.S, 1996 (patent US 5518988 A).

SISLER, E.C.; DUPILLE, E.; SEREK, M. Effect of 1-methylcyclopropene and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. **Plant Growth Regulation**, v. 8, p. 79–86, 1996.

SISLER, E. C.; SEREK M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 577–582, 1997.

SOTO-ALVEAR, S.; LOLAS, M.; ROSALES, I. M.; CHÁVEZ, E. R.; LATORRE, B. A. Characterization of the bull's eye rot of apple in Chile. **Plant Disease**, v. 97, n. 4, p. 485–490, 2013.

SPOTTS, R. A.; SHOLBERG, P. L.; RANDALL, P.; SERDANI, M.; CHEN, P. M. Effects of 1-MCP and hexanal on decay of d'Anjou pear fruit in long-term cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, v. 44, p. 101-106, 2007.

SPOTTS, R. A.; SEIFERT, K. A.; WALLIS, K. M.; SUGAR, D.; XIAO, C. L.; SERDANI, M.; HENRIQUEZ, J. L. Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. **Mycological research**, v. 113, p. 1301–1311, 2009.

STANGER, M. C.; ARGENTA, L. C.; STEFFENS, C. A.; AMARANTE, C. V. T. Estádio de maturação para o período Ideal de colheita de maçãs 'Daiane' destinadas à armazenagem. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 977-989, 2013.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, p. 18–46, 2010.

STORCH, T. T.; FINATTO, T.; PEGORARO, C.; DAL CERO, J.; LAURENS, F.; ROMBALDI, C. V.; QUECINI, V.; GIRARDI, C. L. Ethylene-dependent regulation of α -L-arabinofuranosidase is associated to firmness loss in 'Gala' apples under long term cold storage. **Food Chemistry**, v. 182, p. 111–119, 2015.

SU, J.; TU, K.; CHENG, L.; WANG, M.; XU, H.; ZHAN, G. Wound-induced H₂O₂ and resistance to *Botrytis cinerea* decline with the ripening of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, n. 1, p. 64–70, 2011.

SUDISHA, J; SHARATHCHANDRA, R. G.; AMRUTHESH, K. N.; KUMAR, A.; SHETTY, S. Pathogenesis related proteins in plant defense response. In: MÉRILLON, J. M. RAMAWAT, Kishan Gopal (Org.). **Pant defence: biological control**. Holanda: Springer, 2012, p. 379–403.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TASSONI, A.; WATKINS, C. B.; DAVIES, P. J. Inhibition of the ethylene response by 1-MCP in tomato suggests that polyamines are not involved in delaying ripening but may moderate the rate of ripening or over-ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 12, p. 3313–3325, 2006.

TATSUKI, M.; ENDO, A. Analyses of expression patterns of ethylene receptor genes in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits treated with or without 1-methylcyclopropene (1-MCP). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 75, n. 6, p. 481–487, 2006.

THE STATISTICS PORTAL (STATISTA 2017/2018). Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/279555/global-top-apple-producing-countries/>. Acesso em: 08 março 2019.

TIAN, M. S., PRAKASH, S.; ELGAR, H. J.; YOUNG, H.; BURMEISTER, D. M.; ROSS, G. S. Responses of strawberry fruit to 1-methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene. **Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 83–90, 2000.

TODA FRUTA. Disponível em: < <https://www.todafruta.com.br/artigo-exclusivo-estado-atual-da-cultura-da-macieira/> > Acesso em: 05 março 2019.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, JAM. Primer3Plus an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W1–W4, 2007.

WANG, D.; YEATS, T.; ULUISIK, S.; ROSE, J. K. C.; SEYMOUR, G. B. Fruit softening: Revisiting the role of pectin. **Trends in Plant Science**, v. 23, p. 302–310, 2018.

WATKINS, C. B.; NOCK, J. F.; WHITAKER, B. D. Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, p. 17–32, 2000.

WATKINS, C. B. Principal and practices of postharvest handling and stress. In: FERREE, D.C.; WARRINGTON, I.J. Apples: Botany, production and uses. Wallingford: CABI Publishing, 2003, p.585-614.

WATKINS, C. B.; ERKAN, M.; NOCK, J. F.; IUNGERMAN, K. A.; BEAUBRY, R. M.; MORAN, R. E. Harvest data effects on maturity, quality, and storage disorders of 'Honeycrisp' apples. **HortScience**, v. 40, p.164–169, 2005.

WATKINS, C. B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 389–409, 2006.

WATKINS, C. B. The effects of 1-MCP on the development of physiological storage disorders in horticultural crops. **Stewart Postharvest Review**, v. 2, p.11–18, 2007.

WATKINS, C. B. Dynamic controlled atmosphere storage – a new technology for the New York storage Industry? *New York Fruit Quarterly*, v. 16, p. 23–26, 2008a.

WATKINS, C. B. Overview of 1-methylcyclopropene trials and uses for edible horticultural crops. **HortScience**, v. 43, p. 86–94, 2008b.

WATKINS, C. B.; GAPPER, N. E.; NOCK, J. F.; GIOVANNONI, J. J.; RUDELL, D. A.; LEISSO, R.; LEE, J.; BUCHANAN, D.; MATTHEIS, J.; HERTOGE, M. L. A. T. M.; NICOLAÏ, B. M.; JOHNSTON, J.; SCHAFFER, R. Interactions between 1-MCP and controlled atmospheres on quality and storage disorders of fruits and vegetables. **Acta Horticulturae**, v. 1071, p. 45–58, 2015.

WESTON, L. A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 283-297, 2013.

YANG, X.; SONG, J.; CAMPBELL-PALMER, L.; FILLMORE, S.; ZHANG, Z. Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 78, p. 55–66, 2013.

YIN, Z.; XIWANG, K.; KANG, Z.; HUANG, L. Apple resistance responses against *Valsa mali* revealed by transcriptomics analyses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 93, p. 85–92, 2016.

ZENG, Y.; YANG, T. A. O. RNA Isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 417a–417e, 2002.

ZHANG, Z.; HUBER, D. J.; HURR, B. M.; RAO, J. Delay of tomato fruit ripening in response to 1-methylcyclopropene is influenced by internal ethylene levels. **Postharvest Biology and Technology**, v. 54, p. 1–8, 2009.

ZHANG, Z.; TIAN, S.; ZHU, Z.; XU, Y.; QIN, G. Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and resistance of jujube (*Zizyphus jujuba* cv. Huping) fruit against postharvest disease. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 13–19, 2012.

Apêndices

Apêndice A – Resultados do teste *F*

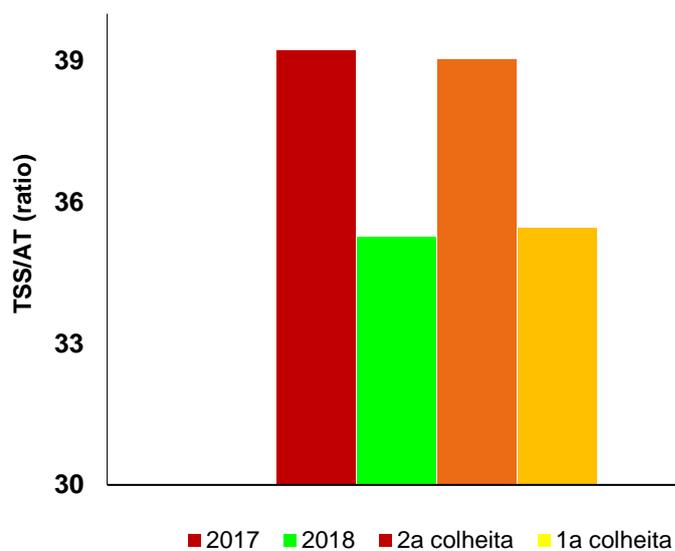
Tabela 1a – Valor de *F* calculado

Safr	Comparação entre	1ª colheita	
		Diâmetro da lesão	% de podres
2017	1-MCP (depois) x controle	1,84	1,48
	1-MCP (antes) x controle	3,58	3,72
	1-MCP (depois) x 1-MCP (antes)	6,57*	5,52*
2018	1-MCP (depois) x controle	3,73	188*
	1-MCP (antes) x controle	3,65	26,5*
	1-MCP (depois) x 1-MCP (antes)	1,02	7,11*
Safr	Comparação entre	2ª colheita	
		Diâmetro da lesão	% de podres
2017	1-MCP(depois) x controle	1,27	16,5*
	1-MCP (antes) x controle	3,84	3,24
	1-MCP (depois) x 1-MCP (antes)	3,04	5,09*
2018	1-MCP (depois) x controle	2,47	66,9*
	1-MCP (antes) x controle	2,03	2,55
	1-MCP (depois) x 1-MCP (antes)	1,21	26,2*

F crítico = 4,41; nível de significância de 5%, graus de liberdade numerador (1) e do denominador (18).

* *F* crítico < *F* calculado, variâncias não homogêneas

Apêndice B – Gráfico com o valor médio de *ratio* na safra 2017 e 2018 e valor médio na 1ª e 2ª colheita



Apêndice C – Resultados do amolecimento de polpa

Tabela 1c- Amolecimento de polpa de maçãs armazenadas por 90 dias em atmosfera controlada, referente a duas safras (2017 e 2018), em duas colheitas (1ª e 2ª), tratadas ou não com 1-MCP, e inoculadas com fungo ou com água estéril

Variáveis independentes				Amolecimento de polpa (N)
Safra	Ponto de colheita	1-MCP	Fungo	
2018	2ª	Com	Com	6,50 b,c,d,e
2018	2ª	Com	Sem	9,80 b,c,d
2018	2ª	Sem	Com	10,1 b,c,d
2018	2ª	Sem	Sem	13,9 b
2017	2ª	Com	Com	10,9 b,c,d
2017	2ª	Com	Sem	14,5 b
2017	2ª	Sem	Com	11,8 b,c
2017	2ª	Sem	Sem	13,1 b,c
2018	1ª	Com	Com	4,67 d,e
2018	1ª	Com	Sem	4,70 d,e
2018	1ª	Sem	Com	10,4 b,c,d
2018	1ª	Sem	Sem	2,65 e
2017	1ª	Com	Com	28,9 a
2017	1ª	Com	Sem	28,3 a
2017	1ª	Sem	Com	26,4 a
2017	1ª	Sem	Sem	25,9 a

Número de repetições biológicas = 3.

Teste Tukey ($\alpha = 0,05$), letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística.