

AQUIDAUANA MIQUELOTO

**AÇÃO DAS AUXINAS NA FUNCIONALIDADE DO XILEMA E
OCORRÊNCIA DE “BITTER PIT” EM MAÇÃS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M669a
2014 Miqueloto, Aquidauana, 1984-
Ação das auxinas na funcionalidade do xilema e
ocorrência de "Bitter pit" em maçãs / Aquidauana
Miqueloto. - Viçosa, MG, 2014.
xi, 46f. : il. ; 29 cm.

Orientador : Fernando Luiz Finger.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Maça. 2. *Malus domestica*. 3. Qualidade. 4. Plantas -
Distúrbio fisiológico. 5. Cálcio. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 571.2

AQUIDAUANA MIQUELOTO

**AÇÃO DAS AUXINAS NA FUNCIONALIDADE DO XILEMA E
OCORRÊNCIA DE “BITTER PIT” EM MAÇÃS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 16 de dezembro de 2014.

Cassandro Vidal Talamini do Amarante

Edgard Augusto de Toledo Picoli

Teresa Drummond Correia Mendes

Sérgio Tonetto de Freitas

Fernando Luiz Finger
(Orientador)

*Aos meus pais,
meu irmão e meu noivo pelo
incentivo e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos e proteção que concedeu em minha vida, por em muitos momentos proporcionar-me sabedoria para solucionar as dificuldades e problemas encontradas nessa caminhada.

Aos meus familiares, em especial minha mãe Zanete Helt Miqueloto, ao meu pai Neri Luiz Miqueloto, ao meu irmão Tiago Miqueloto e meu noivo Odimar Zanuzo Zanardi agradeço pela dedicação, carinho e aos mais sublimes sentimentos e amor que me engrandeceu e me tornou uma pessoa mais justa e centrada nos meus objetivos.

As minhas amigas Thaís Roseli Correa, Rebeca Patrícia Omena, Genaina Aparecida de Souza e Teresa Drummond Correia Mendes por terem me ajudado a enfrentar e vencer os desafios ao longo do doutorado.

Aos professores Fernando Luiz Finger, Cassandro Vidal Talamini do Amarante e Edgard Augusto de Toledo Picoli, e ao Pesquisador Sergio Tonetto de Freitas, por terem me propiciado a realização desse projeto, pelos ensinamentos e orientações, os quais foram de grande importância para a minha formação.

A Elizabeth Mitcham, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar meu projeto de pesquisa no laboratório de pós-colheita da Universidade da Califórnia, EUA.

A UFV, pela concessão da bolsa e por ter me cedido à estrutura física para a realização de parte do projeto.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Pós-Colheita da UFV, UDESC e da UC Davis, pelo auxílio na execução do projeto e pelos ensinamentos compartilhados durante esse período.

Enfim, a todos que de alguma forma estiveram presentes e participaram desta etapa e que me incentivaram nesta caminhada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPÍTULO I - Ação do ácido naftaleno acético (ANA) e do inibidor de auxina ácido 2,3,5-triodobenzóico (TIBA) sobre a ocorrência de "bitter pit" em maçãs 'Braeburn'.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
1.1.-INTRODUÇÃO.....	8
1.2.-MATERIAL E MÉTODOS.....	9
1.3.-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
1.4.-CONCLUSÃO.....	25
1.5.-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO II - Ação do ácido naftaleno acético (ANA) e do inibidor de auxina ácido 2,3,5-triodobenzóico (TIBA) sobre os atributos físicos-químicos e a ocorrência de "bitter pit" em maçãs 'Braeburn'.....	29
RESUMO.....	30
ABSTRACT.....	31
2.1.-INTRODUÇÃO.....	32
2.2.-MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.3.-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
2.4.-CONCLUSÃO.....	43
2.5.-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
CONCLUSÃO GERAL.....	46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1.** Massa fresca de frutos de maçãs ‘Braeburn’ a estação de crescimento (60 aos 164 dias após a plena floração; DAPF). Cada ponto representa a média de dois frutos coletados. Barras verticais indicam o erro padrão da média.....14
- FIGURA 2.** Massa fresca (A) e diâmetro de frutos (B) de maçãs ‘Braeburn’ aos 164 dias após a plena floração (DAPF). Valores médios com letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste LSD ($p < 0,05$). Barras verticais indicam o erro padrão da média.....15
- FIGURA 3.** Números de vasos do xilema do sistema cortical primário, coloridos na região proximal (A) e distal (B) dos frutos de maçãs ‘Braeburn’, colhidas dos 60 aos 164 dias após a plena floração (DAPF). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa calculadas através do teste LSD ($p < 0,05$).....16
- FIGURA 4.** Coloração do córtex ($L \times h^\circ$) na região proximal (A) e na região distal (B), dos 60 aos 164 dias após a plena floração (DAPF), indicando a funcionalidade do xilema no sistema cortical secundário em maçãs ‘Braeburn’. Aumento nos valores de $L \times h^\circ$ indica redução na coloração dos vasos do xilema no sistema cortical secundário e perda na funcionalidade do xilema. Barras verticais indicam a diferença mínima significativa calculadas através do teste LSD ($p < 0,05$).....18
- FIGURA 5.** Cálcio solúvel total ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) na polpa, na região distal de maçãs ‘Braeburn’, quantificado aos 164 dias após a plena floração (DAPF). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$). Barras verticais indicam o erro padrão da média.....21
- FIGURA 6.** Atividade enzimática da pectinametilesterase (PME) na polpa região distal dos frutos de maçãs ‘Braeburn’ aos 164 DAPF. Barras verticais indicam o erro padrão da média e letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).....22
- FIGURA 7.** Expressão de genes que codificam para os transportadores CAX/ H^+ e H^+ -PPase na polpa, região distal, dos frutos em maçãs ‘Braeburn’ aos 164 DAPF. Barras verticais indicam o erro padrão da média e letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).....24
- FIGURA 8.** Incidência de “bitter pit” (BP) em maçãs ‘Braeburn’ aos 164 DAPF. Barras verticais indicam o erro padrão da média e letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).....25

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Extravazamento de eletrólitos na região distal de maçãs 'Braeburn' aos 164 DAPF. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$). Valores médios ($n = 18$) \pm erro padrão da média.....43

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Concentrações totais de N, K, Ca e Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca) na polpa, na região distal de maçãs 'Braeburn', quantificadas aos 60, 89 e 164 dias após a plena floração (DAPF).....20

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Efeito de ácido naftaleno acético (ANA) e de ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) na firmeza de polpa (N), acidez titulável (AT; % de ácido málico), amido (1-5) e sólidos solúveis (SS; %) em maçãs 'Braeburn' quantificados aos 164 DAPF.....40

TABELA 2. Efeito do ácido naftaleno acético (ANA) e do ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) na taxa respiratória, produção de etileno, firmeza de polpa (N), acidez titulável (AT; % de ácido málico) e sólidos solúveis (SS; %) em maçãs 'Braeburn' armazenadas por dois meses em atmosfera do ar (1°C e UR de 90-95%), seguido de dois dias de exposição a temperatura ambiente (25°C e UR de 55-60%).....41

TABELA 3. Coloração da casca (atributos L e h°) nos lados mais e menos expostos a radiação solar, Ca solúvel total e severidade e incidência de "bitter pit" (BP), determinados em frutos de macieiras 'Braeburn' tratadas com ácido naftaleno acético e ácido 2,3,5-triidobenzóico, armazenados por dois meses em atmosfera do ar (1°C e UR de 90-95%), seguido de dois dias de exposição a temperatura ambiente (25°C e UR de 55-60%).....42

RESUMO

MIQUELOTO, Aquidauana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **Ação das auxinas na funcionalidade do xilema e ocorrência de “bitter pit” em maçãs.** Orientador: Fernando Luiz Finger. Coorientador: Cassandro Vidal Talamini do Amarante.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da aplicação do ácido naftaleno acético (ANA) e do inibidor de transporte de auxina ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) na diferenciação e funcionalidade dos vasos do xilema, expressão de genes que codificam para proteínas de transporte de Ca no tonoplasto, atividade da pectinametilesterase (PME) e a ocorrência de “bitter pit” (BP), bem como sua influência sobre os atributos físico-químicos em maçãs ‘Braeburn’. Macieiras ‘Braeburn’ foram pulverizadas com duas concentrações de ANA (10 e 20 mg L⁻¹) e TIBA (10 e 20 mg L⁻¹) e como tratamento controle, água destilada. As aplicações foram realizadas semanalmente, durante o período de 50 a 106 dias após a plena floração (DAPF). Os frutos foram colhidos semanalmente, durante o período de 60 a 106 DAPF, e a cada 15 dias dos 107 aos 164 DAPF (até a colheita comercial), e avaliados quanto a funcionalidade do xilema e composição mineral. Os frutos colhidos aos 164 DAPF foram avaliados quanto à permeabilidade de membrana, nível de expressão de genes que codificam para bombas eletrogênicas e transportadores de Ca e atividade da PME. Seis repetições de 100 frutos foram armazenadas em atmosfera do ar a 1 °C e UR 90-95%, por dois meses, e avaliados quanto a coloração da epiderme, respiração, produção de etileno, pH, firmeza de polpa, sólidos solúveis, acidez titulável, Ca solúvel total e incidência e severidade de BP. A aplicação de ANA 20 mg L⁻¹ proporcionou maior funcionalidade do xilema nos sistemas cortical primário e secundário das regiões proximal e distal dos frutos, quando comparado ao das plantas tratadas com TIBA 20 mg L⁻¹. As concentrações de Ca total, aos 60, 89 e 164 DAPF, e de Ca solúvel total aos 164 DAPF, na polpa da região distal dos frutos, foram maiores no tratamento com ANA (10 e 20 mg L⁻¹), comparadas com os demais tratamentos. Frutos tratados com ANA (10 e 20 mg L⁻¹) tiveram redução de ~50% na atividade da PME, na polpa da região distal dos frutos, em relação ao tratamento com TIBA (10 e 20 mg L⁻¹). Os tratamentos com TIBA (10 e 20 mg L⁻¹) aumentaram a expressão de *CAX2* e *H⁺-PPase* em comparação aos tratamentos com

ANA (10 e 20 mg L⁻¹). Após dois meses de armazenamento, os frutos tratados com ANA (10 e 20 mg L⁻¹) apresentaram menores taxas respiratórias e de produção de etileno e exibiram menor coloração vermelha da epiderme no lado mais exposto a radiação solar na planta, em relação aos frutos tratados com TIBA. Plantas tratadas com ANA 20 mg L⁻¹ apresentaram frutos com maiores valores de acidez titulável e sólidos solúveis do que nos demais tratamentos. Os frutos submetidos a aplicação de auxina, mantiveram níveis mais elevados de Ca solúvel total após o armazenamento, o que contribui para a manutenção da integridade da membrana plásmática e redução na incidência e severidade de BP. De acordo com os resultados obtidos as auxinas contribuem para a redução da ocorrência de BP e para a manutenção da qualidade dos frutos em maçãs 'Braeburn'.

ABSTRACT

MIQUELOTO, Aquidauana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2014. **Action of auxins on function of the xylem vessel and bitter pit occurrence in apple fruit** Adviser: Fernando Luiz Finger. Co-adviser: Cassandro Vidal Talamini do Amarante

The aim of this study was to evaluate the effect of naphthaleneacetic acid (NAA) and auxin inhibitor transport 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) on xylem vessel differentiation and function, expression of genes encoding calcium (Ca) transport proteins into the vacuole, pectin methylesterase activity (PME) and bitter pit (BP) incidence, as well as, the influence on physical-chemical attributes in Braeburn apples. 'Braeburn' trees were sprayed with two concentrations of NAA (10 and 20 mg L⁻¹) and TIBA (10 and 20 mg L⁻¹). The control treatment was sprayed with distilled water. The applications were carried out weekly from 50-106 days after full bloom (DAFB). The fruit were harvested weekly from 60-106 DAFB and each 15 days from 107-164 DAFB (commercial harvest) and were evaluated for xylem functionality and mineral composition. Fruits harvested at 164 DAFB were evaluated for membrane permeability, expression of genes encoding Ca pumps and carriers and PME activity. Six replications of 100 fruits were stored in a cold room at 1°C and RH 90-95% for two months. The fruit were evaluated for skin color, respiration, ethylene production, pH, firmness, total soluble solid, titratable acidity, total soluble Ca, BP incidence and severity. The use of 20 mg L⁻¹ NAA increased the functionality of the xylem of proximal and distal regions as compared to 20 mg L⁻¹ TIBA-treated fruit. Ca content at 60, 89 and 164 DAFB and the total soluble Ca at 164 DAFB in the distal flesh of the fruit, were higher in fruit treated with NAA (10 and 20 mg L⁻¹) than in TIBA-treated fruits and water (control). NAA-treated fruit had 50% lower PME activity in the distal flesh of the fruits, compared to TIBA treatment (10 and 20 mg L⁻¹). The TIBA-treated fruits (10 and 20 mg L⁻¹) showed higher *CAX2* and *H⁺-PPase* expression than the NAA treatment (10 and 20 mg L⁻¹). After two months of storage, the NAA-treated fruit had lower respiration and ethylene production and showed lower red coloration of the sun exposed skin compared to TIBA-treated fruit. Plants treated with ANA 20 mg L⁻¹ showed fruit with higher total soluble solids and titratable acidity. Fruit subjected to application of auxin maintained higher levels of

soluble Ca after storage, which contributed to the main to membrane integrity, and reduced BP incidence and severity. According our results auxin reduces BP incidence and maintains 'Braeburn' fruit quality after harvest.

INTRODUÇÃO GERAL

As desordens fisiológicas em plantas vêm sendo estudadas por mais de 100 anos, no entanto, os mecanismos envolvidos ainda são pouco conhecidos (TAYLOR e LOCASCIO, 2004). Dentre as desordens fisiológicas destaca-se o “bitter pit” (BP) em maçã e podridão estilar em tomate, pimentão, melancia e melões, e que são responsáveis por causar grandes perdas pós-colheitas.

O BP em maçãs é caracterizado por manchas escuras que ocorrem logo a abaixo da epiderme (AMARANTE et al., 2006), localizada principalmente na região pistilar do fruto.

A ocorrência de BP está associada à baixa concentração de cálcio (Ca), excesso de nitrogênio (N), potássio (K) e magnésio (Mg) (FERGUSON e WATKINS, 1989). No entanto, dentre estes fatores, a deficiência de Ca é o principal fator associado à ocorrência de BP.

O Ca é um elemento mineral que desempenha um importante papel na preservação da integridade estrutural de membranas e de parede celular dos frutos (POOVAIAH, 1986). O Ca se liga aos fosfolipídeos e proteínas de membranas (KENDAL, 2004), preservando a integridade e retardando a senescência do fruto. Contudo, frutos com baixos níveis de Ca tendem a apresentar um colapso na membrana plasmática, aumentando a predisposição ao BP (FREITAS et al., 2010).

A deficiência de Ca, que leva a ocorrência do BP, pode estar associada a perda na funcionalidade do xilema do fruto (DRAŽETA et al., 2004), bem como ao aumento na atividade da enzima pectina metilesterase (PME) na parede celular, e no nível de expressão de genes que codificam para as bombas eletrogênicas e transportadores de Ca que permitem o acúmulo de Ca dentro do vacúolo.

Com objetivo de reduzir a ocorrência de BP, são feitas aplicações de cloreto de Ca sobre os frutos, principalmente em pré-colheita. Contudo, essa técnica é pouco eficiente, pois o Ca tem baixa mobilidade da epiderme para a polpa do fruto. Dessa forma, vem se buscando novas alternativas, dentre uma delas a utilização de reguladores de crescimento, como auxinas.

A auxina é um hormônio sintetizado em órgãos em desenvolvimento, apresenta transporte polar e basípeto e atua na regulação do desenvolvimento dos frutos e na indução e diferenciação de elementos de vasos de xilema (TAIZ e ZEIGER, 2010). Dessa forma, indução de xilogênese pela auxina poderia aumentar o aporte de Ca para o fruto e reduzir a predisposição a ocorrência de BP. Além disso, a auxina pode influenciar as características físico-químicas dos frutos, como tamanho, firmeza de polpa e composição mineral (FABBRONI et al., 2006). Há alguns trabalhos relatando que a aplicação de auxina na formulação sintética contribui para a manutenção da qualidade dos frutos de maçã (STERN e BEN-ARIE, 2008).

Inibidores de transporte de auxina, como ácido N-1-naftilftalâmico (NPA) e ácido 2,3,5- triiodobenzóico (TIBA), competem com a auxina pela mesma proteína carreadora, interferindo no transporte polar e basípeto da auxina (SANTANA et al., 1970). O TIBA atua em nível do complexo protéico *pin-shaped inflorescences*-PIN, competindo com a auxina pelo sítio de ligação desta proteína de membrana (SANTANA et al., 1970). Assim, uma vez que as moléculas TIBA estejam ligadas às proteínas PIN, o fluxo descendente da maior parte da auxina produzida é interrompido. Jacobs (1952) relatou que a baixa concentração de auxina em folhas maduras de *Coleus* foi o fator limitante para a regeneração dos vasos do xilema. Isto demonstra que a auxina é o principal hormônio responsável pela formação, diferenciação e manutenção da funcionalidade dos vasos do xilema.

Já os inibidores de transporte de auxina podem atuar negativamente sobre a qualidade dos frutos (BUXTON, 2005). Dessa forma, a aplicação de inibidores de transporte de auxina pode reduzir a diferenciação e funcionalidade dos elementos de vasos do xilema no pedúnculo e no interior de maçãs, reduzindo assim o aporte de Ca para o interior do fruto, e aumentando a predisposição à ocorrência de BP, bem como interferindo sobre os atributos físico-químicos dos frutos.

Até o presente, não se sabe qual é o efeito da auxina e de inibidores de auxina sobre diferenciação de vasos do xilema no interior do fruto, expressão de transportadores minerais do tonoplasto e atividade da PME, que afetam a ocorrência de BP.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da aplicação do ácido naftaleno acético (ANA) e do inibidor de transporte de auxina TIBA na funcionalidade dos vasos

do xilema, expressão das proteínas de transporte mineral do tonoplasto, atividade da PME e a ocorrência de BP, bem como sua influência sobre os atributos físico-químicos em maçãs 'Braeburn'.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARANTE, C.V.T.; CHAVES, D.V.; ERNANI, P.R. Composição mineral e severidade de "bitter pit" em maçãs 'Catarina'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 51-54, 2006.
- BUXTON, K.N. **Preharvest practices affecting postharvest quality of 'Hyward' kiwifruit**. Massey University, New Zeland, 2005, 288 p.
- DRAŽETA, L.; LANG, A.; HALL, A.J.; VOLZ, R.K. Causes and effects of changes in xylem functionality in apple fruit. **Annals of Botany**, v. 93, p. 275-282, 2004.
- FABBRONI, C.; COSTA, F.; BREGOLI, A.M.; COSTA, G. Effect of auxin on fruit morphogenesis: physiological and molecular aspects in kiwifruit ripening. **Acta Horticulturae**, n. 753, p. 541-548, 2006.
- FERGUSON, I.B.; WATKINS, C.B. Bitter-pit in apple fruit. **Horticultural Reviews**, New York, v. 11, p. 289-355, 1989.
- JACOBS, W.P. The role of auxin in differentiation of xylem around a wound. **American Journal of Botany**, v. 39, p. 301-309, 1952.
- KENDAL, D.H. The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. **Plant Physiology**, v. 136, p. 2438-2442, 2004.
- POOVAIAH, B.W. Role of calcium in prolonging storage life of fruit and vegetables. **Food Technology**, v. 40, p. 86-89, 1986.
- SANTANA, R.; OHLROGGE, A.J.; CHRISTIAN, J.E.; BRECKINRIDGE, J.R. Foliar absorption and distribution of 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) in soybeans (*Glycine max*). **Agronomy Journal**, v. 62, p. 731-738, 1970.
- STERN, R.A.; BEN-ARIE, R. Effect of the synthetic auxin 3,5,6-TPA on pre-harvest drop, fruit quality and maturation of 'Delicious' and 'Jonathan' apples. **Acta Horticulturae**, n. 774, p. 251-258, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 793 p.
- TAYLOR, M.D.; LOCASCIO, S.J. Blossom-end rot: A calcium deficiency. **Journal Plant Nutrition**, v. 27, p. 123-139, 2004.

CAPITULO I

Ação do ácido naftaleno acético e do inibidor de auxina ácido 2,3,5-triodobenzóico sobre a ocorrência de "bitter pit" em maçãs 'Braeburn'

RESUMO

MIQUELOTO, Aquidauana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **Ação do ácido naftaleno acético e do inibidor de auxina ácido 2,3,5-triidobenzóico sobre a ocorrência de "bitter pit" em maçãs 'Braeburn'**. Orientador: Fernando Luiz Finger e coorientador: Cassandro Vidal Talamini do Amarante.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da aplicação de ácido naftaleno acético (ANA) e do inibidor de transporte de auxina ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) na funcionalidade dos vasos do xilema, expressão de genes que codificam para as proteínas de transporte do Ca para o interior dos vacúolos, atividade da pectinametilesterase (PME) e ocorrência de "bitter pit" (BP) em maçãs. Macieiras 'Braeburn' foram pulverizadas com duas concentrações de ANA (10 e 20 mg L⁻¹) e TIBA (10 e 20 mg L⁻¹), e como tratamento controle foi utilizado água destilada. As aplicações foram realizadas semanalmente, durante o período de 50 a 106 dias após a plena floração (DAPF). Os frutos foram colhidos semanalmente, durante o período de 60 a 106 DAPF, e a cada 15 dias dos 107 aos 164 DAPF (colheita comercial), e avaliados quanto a funcionalidade do xilema e composição mineral. O uso de ANA 20 mg L⁻¹ proporcionou maior funcionalidade do xilema nos sistemas cortical primário e secundário das regiões proximal e distal dos frutos, quando comparado ao das plantas tratadas com TIBA 20 mg L⁻¹. As concentrações de Ca total, aos 60, 89 e 164 DAPF, e de Ca solúvel total aos 164 DAPF, na polpa da região distal dos frutos, foram maiores no tratamento com ANA (10 e 20 mg L⁻¹), comparadas com os demais tratamentos. Frutos tratados com ANA (10 e 20 mg L⁻¹) apresentaram redução de ~ 50% na atividade da PME, na polpa da região distal dos frutos, em relação ao tratamento com TIBA (10 e 20 mg L⁻¹). Os tratamentos com TIBA (10 e 20 mg L⁻¹) aumentaram a expressão de *CAX2* e *H⁺-PPase* em comparação aos tratamentos com ANA (10 e 20 mg L⁻¹). Os tratamentos com ANA reduziram a incidência de BP em mais de 73%, em comparação aos tratamentos com TIBA e em relação ao controle. Os resultados mostram que a redução na incidência de BP em maçã 'Braeburn' está associada à ação de auxinas, promovendo o aporte de Ca através da preservação da funcionalidade do xilema, bem como pela redução da atividade da PME e dos transportadores *CAX* e *H⁺-PPase*, contribuindo assim para o aumento na disponibilidade de Ca solúvel total nos frutos.

Palavras-chave: *Malus domestica*, regulador de crescimento, distúrbio fisiológico, cálcio.

ABSTRACT

MIQUELOTO, Aquidauana, D.Sc., Federal University of Viçosa, December, 2014. **Action of naphthaleneacetic acid and auxin inhibitor transport 2,3,5 triiodobenzoic acid on bitter pit occurrence in ‘Braeburn’ apples.** Adviser: Fernando Luiz Finger and co-adviser: Cassandro Vidal Talamini do Amarante

The aim of this study was to evaluate the effect of naphthaleneacetic acid (NAA) and the auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) on the xylem vessels differentiation and function, expression of genes coding for vacuolar calcium (Ca) transport proteins, pectin methylesterase activity (PME) and bitter pit (BP) incidence in apples. Apple trees were sprayed with two concentrations of NAA (10 and 20 mg L⁻¹) and TIBA (10 and 20 mg L⁻¹). The control treatment was sprayed with distilled water. The applications were carried out weekly from 50-106 days after full bloom (DAFB). The fruit were harvested weekly from 60-106 DAFB and each 15 days from 107-164 DAFB (commercial harvest) and were evaluated for xylem functionality and mineral composition. The treatment 20 mg L⁻¹ NAA resulted in higher number of functional xylems in proximal and distal regions of the primary and secondary cortical vascular system in the fruit, compared to 20 mg L⁻¹ TIBA-treated fruit. Ca content, at 60, 89 and 164 DAFB and the soluble total Ca at 164 DAFB, were higher in fruit treated with NAA (10 and 20 mg L⁻¹) than in TIBA-treated fruits and water (control). NAA-treated fruit had 50% lower PME activity in the distal fruit flesh, compared to TIBA treatment (10 and 20 mg L⁻¹). The fruit treated with TIBA (10 e 20 mg L⁻¹) had higher *CAX2* and *H⁺-PPase* than NAA treatment fruit (10 and 20 mg L⁻¹). NAA-treated fruits showed about 73% lower BP incidence, compared to TIBA treated fruit. Our results show that high auxin transport in the plant reduces ‘Braeburn’ fruit susceptibility to BP, promoting fruit Ca uptake, preserving xylem functionality, and reducing the PME activity and *CAX* and *H⁺-PPase* expression, thereby contributing to higher Ca availability to normal cellular function.

Keywords: *Malus domestica*, growth regulator, physiological disorder, calcium.

1.1. – INTRODUÇÃO

A cultura da macieira é de grande importância para o panorama econômico mundial. No entanto, ocorrem elevadas perdas de frutos em pós-colheita, ocasionadas, principalmente, por distúrbios fisiológicos, como o “bitter pit” (BP). No Sul do Brasil, o BP pode ocasionar até 30% de perdas de frutos em pós-colheita, em condições de clima e manejo predisponentes a sua ocorrência (BASSO, 2002).

O BP caracteriza-se pela presença de manchas escuras na polpa, que desidratam e formam pequenas depressões na epiderme (AMARANTE et al., 2006) especialmente na região distal dos frutos. Esse distúrbio está relacionado com o baixo teor de cálcio (Ca) e os altos teores de potássio (K), magnésio (Mg) e nitrogênio (N) nos frutos (FERGUSON e WATKINS, 1989). Além disso, pode estar associado com a perda da funcionalidade dos elementos de vaso do xilema, que reduz o aporte de Ca para os frutos (MIQUELOTO et al., 2014). Investigações recentes têm demonstrado que a incidência do BP também está relacionada com o aumento da expressão e atividade das proteínas transportadoras na membrana do vacúolo (tonoplasto), como CAX/H⁺, Ca-ATPase, H⁺-PPase e V-ATPase (FREITAS et al., 2010). Essas proteínas atuam na regulação da homeostase do Ca na célula, e quando em elevada atividade no tonoplasto, complexam o Ca no interior do vacúolo com compostos fenólicos, oxalatos, carbonatos e fosfatos, tornando-o indisponível e impedido de realizar suas funções celulares (WHITE e BROADLEY, 2003). Frutos com BP, apresentam elevada expressão de genes que codificam para enzimas de parede celular, como a pectinametilesterase (PME), as quais criam sítios de ligação para o Ca na parede celular (FREITAS et al., 2010), reduzindo a concentração desse elemento para outras funções celulares, o que pode aumentar a predisposição dos frutos a manifestar os sintomas do BP.

As aplicações de cloreto de cálcio em pré e pós-colheita dos frutos, tem sido uma alternativa adotada pelos fruticultores para reduzir a incidência do BP em maçãs. No entanto, esta técnica tem sido pouco eficiente, devido à baixa mobilidade do Ca nos frutos. Dessa forma, a aplicação de reguladores de crescimento, como a auxina, poderia auxiliar no transporte e na distribuição do Ca no interior dos frutos e, conseqüentemente, reduzir a incidência de BP. As auxinas são um grupo de hormônios vegetais sintetizado

em estruturas jovens da planta e que desempenham diversas funções, incluindo a diferenciação dos tecidos condutores do xilema (TAIZ e ZEIGER, 2010). Com base nessas funções, as auxinas estão sendo empregadas na agricultura em formulações naturais à base de Ácido Indol Acético (AIA) e sintéticas contendo Ácido Naftaleno Acético (ANA), entre outros, para a regulação da dominância apical, enraizamento de estacas, partenocarpia, inibição de abscisão foliar e regeneração de vasos do xilema (TAIZ e ZEIGER, 2010). Wareing (1964) verificou que aplicação de auxina resultou na divisão cambial, associada com a formação de vaso do xilema e lignificação em caule de choupo (*Populus nigra*) e Freixo (*Fraxinus excelsior*). Já a aplicação do inibidor de auxina ácido naftilftalâmico em *Coleus* inibiu o transporte de auxina e reduziu a xilogênese (JACOBS, 1952). No entanto, não existem informações quanto ao efeito da auxina e de inibidor de auxina sobre diferenciação de vasos do xilema no interior de frutos, expressão de transportadores minerais do tonoplasto e atividade de enzimas de parede celular, que afetam a ocorrência de BP.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do ácido naftaleno acético (ANA) e do inibidor de transporte de auxina ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) na funcionalidade dos vasos do xilema, expressão das proteínas de transporte mineral do tonoplasto, atividade da PME e a ocorrência de “bitter pit” em maçãs ‘Braeburn’ produzidas na região central do Estado da Califórnia, EUA.

1.2. - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em um pomar comercial de macieiras ‘Braeburn’ com 10 anos de idade, conduzidas com líder central, em sistema de média densidade, com espaçamento de 2,0 × 6,0m, localizado no município de Clarskburg, Califórnia, EUA (38° 21’23,27’’N, 121°32’13,62’’O e altitude de 123 m).

Os tratamentos foram constituídos de duas concentrações de ANA (10 e 20 mg L⁻¹) e TIBA (10 e 20 mg L⁻¹). Como tratamento controle foi utilizado água destilada. Os tratamentos foram aplicados com um atomizador costal (Kawashima, KWS 8020) a cada sete dias, durante o período de 50 a 106 dias após a plena floração (DAPF), utilizando um volume de calda de 1000 L ha⁻¹, permitindo uma cobertura uniforme do

dossel das plantas.

Para as avaliações de tamanho (massa fresca e diâmetro) e funcionalidade do xilema, os frutos foram coletados a cada sete dias, durante o período de 60 a 106 DAPF, e a cada 15 dias dos 107 aos 164 DAPF (esta última data correspondendo à maturação comercial dos frutos). Os frutos foram colhidos no início da manhã (momento em que a transpiração era mínima e o potencial hídrico da planta similar ao potencial hídrico do solo), acondicionados em sacos de polietileno contendo água destilada, para evitar a embolia do xilema, e transportados ao laboratório.

A determinação da massa fresca, em 12 frutos de cada tratamento e data de coleta, foi feita em balança digital de precisão (0,0001 g), modelo GE1302, marca Sartorius. O diâmetro médio dos frutos foi determinado com auxílio de um paquímetro manual (Universal, Mitutoyo, 300 mm, sensibilidade de 0,05 mm).

A funcionalidade do xilema foi avaliada de acordo com o método descrito por Dražeta et al. (2004). Para isso, 12 frutos de cada tratamento e data de coleta foram colhidos com o pedúnculo, o qual foi seccionado a aproximadamente 1 mm da sua base e imediatamente imergido em uma solução de corante Safranina a 1%. O corante foi infiltrado nos frutos por cerca de 5 h, em condições normais de transpiração [temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa (UR) de $70 \pm 10\%$], com a utilização de um ventilador para remover os efeitos da camada limítrofe de ar. Os frutos infiltrados foram cortados transversalmente, obtendo duas seções de 10 mm de espessura a partir do pedúnculo e do cálice, sendo que cada uma foi denominada de proximal (região de inserção do pedúnculo) e distal (região pistilar). Após, cada seção foi avaliada quanto ao número e intensidade de coloração dos feixes no sistema vascular cortical primário e secundário, respectivamente. O número de vasos de xilema do sistema cortical primário foi determinado pelo método de análise visual. A quantificação da intensidade de coloração dos vasos do xilema, no sistema vascular cortical secundário, foram determinados de acordo com o método descrito por Miqueloto et al. (2014). Para a determinação da intensidade de coloração do córtex foi quantificada os valores de brilho (L) e ângulo 'hue' (h°) do córtex, com um colorímetro Minolta, modelo CR 400. Através do produto $L \times h^\circ$ foi possível quantificar a intensidade de coloração vermelha do córtex, como resultado do transporte via xilema do corante vermelho (safranina).

Altos valores de $L \times h^\circ$ indicam maior brilho (maior intensidade de coloração branca) e menor coloração vermelha no córtex, indicando assim menor funcionalidade do xilema no sistema vascular cortical secundário.

A quantificação de concentração mineral, expressão gênica de transportadores de Ca no tonoplasto (CAX/H^+ e H^+ -PPase) e a atividade enzimática da PME em polpa foram feitas na seção distal dos frutos. Para isso, amostras de polpa desta região (~ 0,5 cm da polpa, localizada logo abaixo da casca) foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas para posterior análise. As concentrações totais de Ca, Mg, K e N foram determinadas em frutos colhidos aos 60, 89 e 164 DAPF. A concentração total de Ca solúvel, a expressão gênica de transportadores do tonoplasto e a atividade enzimática da PME foram determinadas em frutos colhidos aos 164 DAPF (maturação comercial dos frutos).

As concentrações totais de N foram quantificadas pelo método descrito pela AOAC (2006). O K total foi extraído com ácido acético 2% e quantificado em um espectrofotômetro de chama (JOHNSON e ULRICH, 1959). As concentrações totais de Ca e Mg foram quantificadas em um espectrofotômetro de plasma induzido por argônio (ICP/OES) (MEYER e KELIHER, 1992). O teor de Ca solúvel total foi quantificado em amostra de ~70g de 10 frutos, da qual foi extraído o suco com auxílio de um processador manual, e quantificados com auxílio de um ICP/OES.

Para a expressão gênica de transportadores do tonoplasto, o RNA total foi extraído da polpa do fruto com o reagente PureLink[®] Plant RNA (Ambion[®], NY, USA). A concentração e a qualidade do RNA foram aferidas em um espectrofotômetro UV (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), com comprimentos de onda de 260 e 260/280 nm. Para todas as amostras, 5 µg do RNA total foi submetido à transcriptase reversa, utilizando o SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com o protocolo descrito no kit. Para a análise de PCR em tempo real (“Real Time PCR”) quantitativo, foi adicionado 1 × SYBR green (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) para cada amostra, contendo aproximadamente 100 ng de cDNA sintetizado. Os dados obtidos foram normalizados, baseados no gene controle S19 (proteína ribossomal). Todos os *primers* desenhados continham 20 nucleotídeos, e a temperatura de desnaturação foi de $58 \pm 3^\circ\text{C}$. Para a análise de expressão dos

transportadores do tonoplasto V-ATPase, H⁺-Pirofosfatase, CAX/H⁺ e Ca-ATPases seqüências de nucleotídeos para *Malus domestica* Burk (uma, uma, duas e duas, respectivamente) foram obtidas no Expressed Sequence Tags (EST) database (<http://cgf.ucdavis.edu/home/>). Os transportadores foram nomeados como Ca-ATPase1 (CTG1060377) (NCBI: XM 002325215), Ca-ATPase2 (CTG1063686) (NCBI: AJ310848), CAX2/H⁺ (CTG1073422) (NCBI: NM_112177), CAX3/H⁺ (CTG1076982) (NCBI: XM_002533684), H⁺-Pirofosfatase (EB143723) (NCBI: NM 101437) e V-ATPase (CTG1058311) (NCBI: NM_001036222), conforme descrito por Freitas et al. (2010).

A determinação da atividade da enzima PME na polpa foi determinada seguindo o método descrito por Hagerman e Austin (1986). Os extratos para as determinações da atividade da PME foram obtidos pela maceração de 1 g de tecido da polpa da região distal do fruto seguido da adição de 1 mL do meio de extração (cloreto de sódio 2M e tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 6,5). O extrato obtido foi acondicionado em tubo de eppendorf e centrifugado a 15.000 x g por 10 minutos em uma centrífuga (Personal Centrifuge/Dr-Spin, Korla). A atividade da PME foi determinada pela adição de 250 µL do extrato enzimático em um tampão contendo HEPES-NaOH 0,1M, azul de bromotimol 1g L⁻¹, e pectina cítrica 5 mg L⁻¹ com pH aferido para 7,8. A quantificação da atividade enzimática da PME foi determinada em espectrofotômetro (Epoch, Biotec), no comprimento de onda de 620 nm, e expressa em nmol g⁻¹ min⁻¹.

Para a determinação da incidência de BP, foram utilizados 600 frutos por tratamento (seis amostras de 100 frutos), colhidos na maturação comercial (164 DAPF), e armazenados por dois meses em atmosfera do ar, a 1,0 ± 0,5 °C / 90-95% de UR, e os resultados expressos em percentagem (%).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos com parcelas casualizadas, com cinco tratamentos e seis repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta. Os dados obtidos nos diferentes tratamentos foram inicialmente submetidos ao teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) para verificar a homogeneidade das variâncias, e ao teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO e WILK, 1965), para verificar a normalidade dos resíduos. Os dados de funcionalidade do xilema foram transformados por $(X+1)^{1/2}$ antes de serem submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram separadas pelo teste de

LSD ($p < 0,05$). Os dados de massa fresca de frutos foram submetidos à análise de regressão linear. Todas as análises foram realizadas com *software* estatístico SAS, versão 9.1 (SAS INSTITUTE, 2009).

1.3. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A massa fresca dos frutos controle e tratados com ANA e TIBA (independentemente da concentração utilizada, 10 ou 20 mg L⁻¹) aumentou linearmente dos 60 aos 164 DAPF (Figura 1). O aumento da massa fresca dos frutos durante o período de 60 a 164 DAPF é atribuído aos processos de divisão e expansão celular dos frutos, bem como ao acúmulo de matéria seca e água. Aos 164 DAPF, frutos tratados com ANA 20 mg L⁻¹ exibiram massa fresca 18% superior ao tratamento TIBA 20 mg L⁻¹ (Figura 2). Além disso, plantas pulverizadas com ANA 20 mg L⁻¹ apresentaram maior diâmetro em relação aos demais tratamentos na colheita realizada aos 164 DAPF. A aplicação exógena de ANA 20 mg L⁻¹ promoveu o crescimento dos frutos. As auxinas promovem expansão celular e aumento na força dreno dos frutos, proporcionando maior tamanho (massa e diâmetro) que é verificado na maturação fisiológica, período em que ocorre o cessamento da expansão celular dos frutos (GUARDIOLA, 1996). Além disso, a auxina induz a expressão do gene ARF106, que está relacionada com a expressão da característica que define o tamanho dos frutos (DEVOGHALAERE et al., 2012). Por outro lado, o inibidor de transporte de auxina (TIBA) restringe o desenvolvimento vascular, reduzindo os níveis de auxina, comprometendo o crescimento dos frutos (DRAŽETA et al., 2004).

Plantas tratadas com ANA 20 mg L⁻¹ tiveram maior número de elementos de vasos de xilema coloridos nas regiões proximal e distal dos frutos, em relação ao TIBA 10 e 20 mgL⁻¹, no período de 74 a 89 DAPF, mas não diferindo de ANA 10 mg L⁻¹ (Figuras 3). Entretanto, após os 89 DAPF, o número de vasos de xilema coloridos do sistema cortical primário, nas regiões proximal e distal, não diferiu entre os tratamentos (Figuras 3).

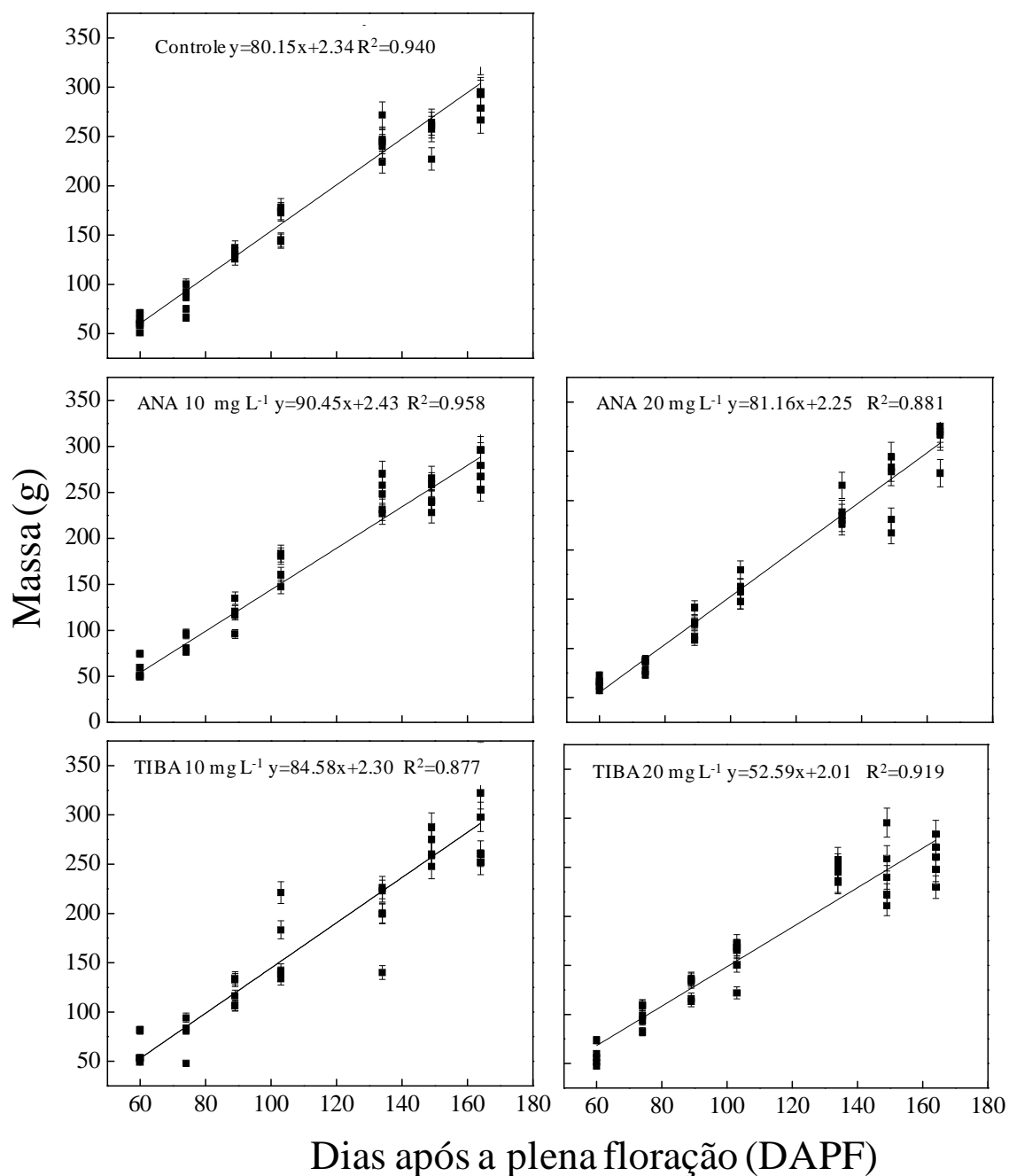


Figura 1. Massa fresca de frutos de maçãs ‘Braeburn’ durante o crescimento e desenvolvimento (60 aos 164 dias após a plena floração; DAPF). Cada ponto representa a média de dois frutos coletados. Barras verticais indicam o erro padrão da média.

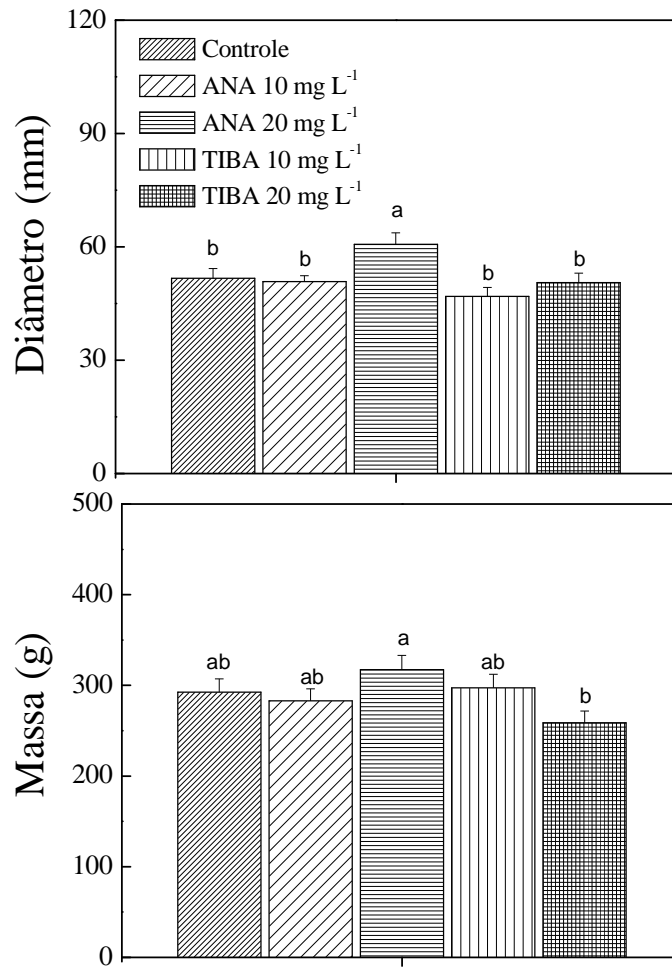


Figura 2. Massa fresca (A) e diâmetro de frutos (B) de maçãs ‘Braeburn’ aos 164 dias após a plena floração (DAFP). Valores médios com letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste LSD ($p < 0,05$). Barras verticais indicam o erro padrão da média.

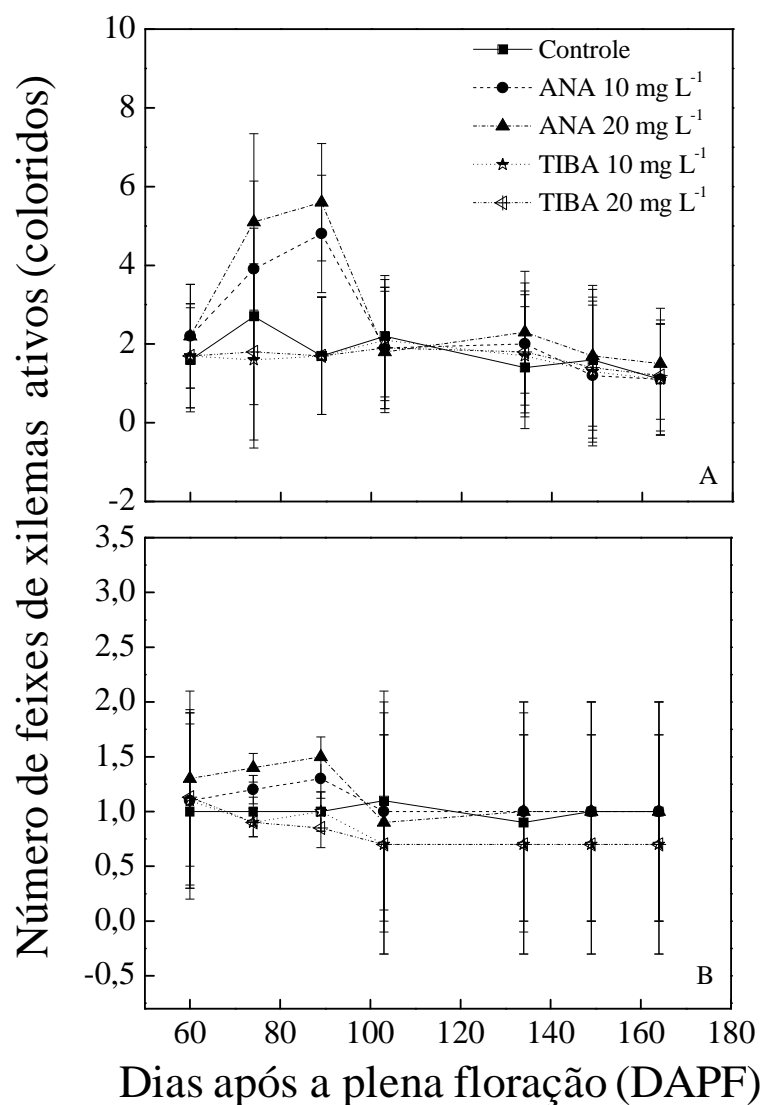


Figura 3. Números de feixes de xilema do sistema cortical primário, ativos (coloridos) na região proximal (A) e distal (B) dos frutos de maçãs ‘Braeburn’, colhidas dos 60 aos 164 dias após a plena floração (DAPF). Barras verticais indicam a diferença mínima significativa calculadas através do teste LSD ($p < 0,05$).

Frutos das plantas tratadas com ANA 20 mg L⁻¹ exibiram maior funcionalidade do xilema nas regiões proximal (aos 74, 89, 103 e 134 DAPF) e distal (aos 74, 89, 134, 149 e 164 DAPF) no sistema cortical secundário, quando comparada aos frutos das plantas pulverizadas com TIBA 20 mg L⁻¹ e ao controle, evidenciado pelo menor valor para coloração do córtex ($L \times h^\circ$) (Figura 4). Esses resultados sugerem que a aplicação exógena ou a síntese de auxina pela planta contribuiu para a funcionalidade dos vasos do xilema durante um maior período de crescimento e desenvolvimento dos frutos. A

auxina também regula a expressão de genes, como AtHB8 em *Arabidopsis thaliana*, que é responsável pela diferenciação de vasos do xilema (MATTSSON et al., 2003). Por outro lado, o TIBA (inibidor de transporte de auxina) promoveu uma redução no número de feixes vasculares do xilema colorido, nos sistemas corticais primários e secundários dos frutos, sugerindo que o mesmo pode suprimir a diferenciação desses elementos de vasos. O TIBA inibe o transporte polar da auxina, bloqueando a saída desse regulador de crescimento da célula, devido a sua ligação aos transportadores de efluxo (complexo protéico *pin-shaped inflorescences*-PIN), ocasionando acúmulo de auxina intracelular (KŘEČEK et al., 2009). Dessa forma, a entrada da auxina na célula não é afetada, mas a sua saída é impedida, ocasionando uma redução no transporte de auxina no interior da planta e também nos frutos, interferindo assim na diferenciação de elementos de vaso de xilema.

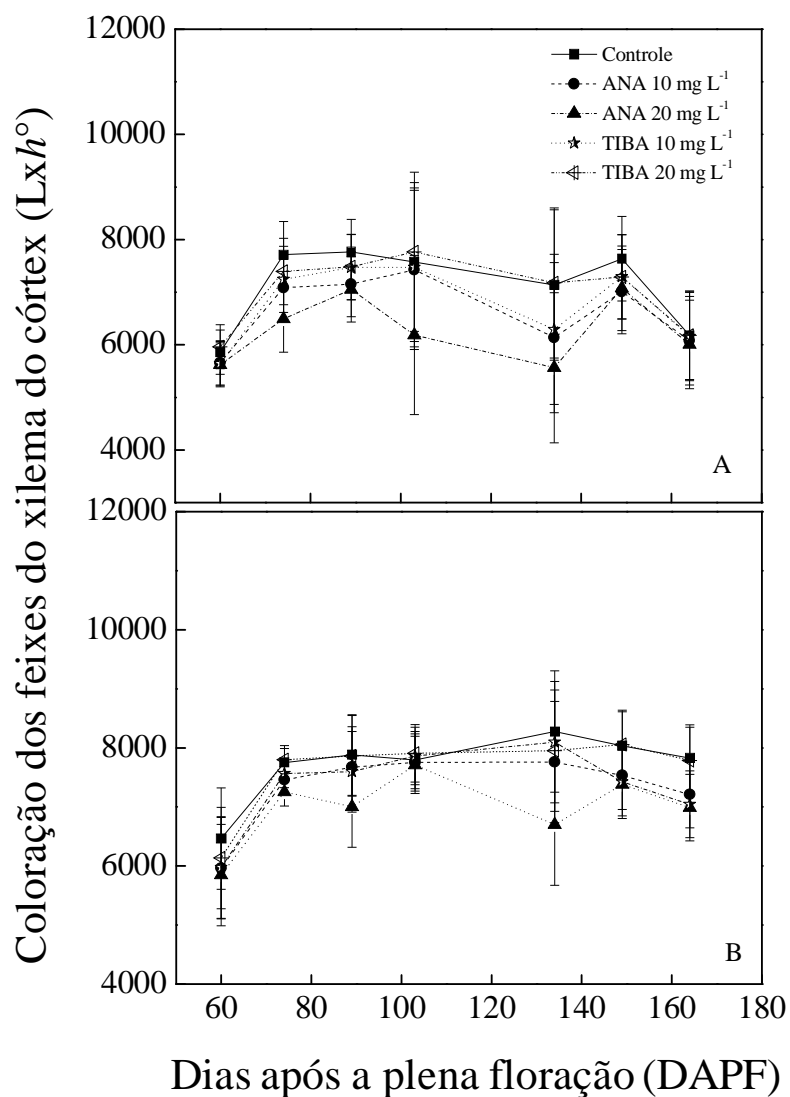


Figura 4. Coloração do córtex ($L \times h^\circ$) na região proximal (A) e na região distal (B), dos 60 aos 164 dias após a plena floração (DAPF), indicando a funcionalidade do xilema no sistema cortical secundário em maçãs 'Braeburn'. Aumento nos valores do $L \times h^\circ$ indica redução na coloração dos vasos do xilema no sistema cortical secundário e perda na funcionalidade do xilema. Barras verticais indicam a diferença mínima significativa calculadas através do teste LSD ($p < 0,05$).

As concentrações de N, K, Ca e Mg total da polpa, na região distal, foram reduzidas durante o período de crescimento e desenvolvimento dos frutos (60, 89 e 164 DAPF) para todos os tratamentos (Tabela 1). Isso ocorre porque frutos sofrem divisão e expansão celular ao longo do desenvolvimento, ocasionando diluição da concentração desses minerais (NACHTIGALL e DECHEN, 2006). Frutos tratados com ANA 20 mg

L⁻¹ exibiram, em relação aos tratamentos com TIBA (10 e 20 mg L⁻¹), aumento nas concentrações de N e Mg totais de, respectivamente, ~ 25% e ~ 13% aos 60 DAPF, ~ 65% e ~ 39% aos 89 DAPF e ~ 51% e ~ 10% aos 164 DAPF (Tabela 1). Para a concentração de K total, somente foi verificada diferença significativa aos 89 DAPF, onde ANA 20 mg L⁻¹ proporcionou uma concentração superior em relação aos tratamentos ANA 10 mg L⁻¹ e TIBA 10 e 20 mg L⁻¹ (Tabela 1). A aplicação do ANA 20 mg L⁻¹ pode ter induzido maior expressão dos canais transportadores de K, resultando em aumento na concentração no interior dos frutos, em relação aos demais tratamentos. Coleóptilos de milho submetidos à aplicação exógena de auxina (ANA) aumentaram em 5 a 7 vezes a expressão do gene *zmk1*, que codifica a proteína de canal K⁺, triplicando o número de canais ativos de K⁺ por célula e promovendo aumento na concentração de K nos tecidos (PHILIPPAR et al., 1999).

A concentração de Ca total na polpa na região distal dos frutos aos 60, 89 e 164 DAPF foi maior em frutos tratados com ANA, independentemente da concentração (Tabela 1). O Ca solúvel total em frutos pulverizados com ANA 10 e 20 mg L⁻¹ foi ~ 25% e ~ 35% superior, respectivamente, em comparação ao TIBA 20 mg L⁻¹ (Figura 5). O transporte e movimento do Ca ao longo do fruto são dependentes do número de feixes vasculares de xilemas funcionais. A aplicação de ANA retardou a perda de funcionalidade dos elementos dos vasos de xilema, aumentando o aporte de Ca nos frutos. O acúmulo de Ca está positivamente relacionada com o transporte polar da auxina, enquanto que o inibidor de transporte de auxina TIBA reduz a concentração desse mineral nos frutos. A habilidade da auxina em estimular o aporte de Ca foi observado em abacates (CUTTING e BOWER, 1989), tomates (BANUELOS et al., 1987) e maçãs (STAHLY e BENSON, 1970), sugerindo que o aumento na concentração de auxina nos tecidos do pericarpo podem elevar a concentração de Ca total e manter a relação de Ca/auxina estáveis (SORCE et al., 2011).

Tabela 1. Concentrações totais de N, K, Ca e Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca) na polpa, na região distal de maçãs ‘Braeburn’, quantificadas aos 64, 89 e 164 dias após a plena floração (DAFP).

Tratamentos	N ($\mu\text{g g}^{-1}$)	K ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ca ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)
60 DAPF				
Controle	7500,0 a	11566,7 a	656,7 ab	810,0 a
ANA 10 mg L ⁻¹	6000,0 b	11433,3 a	683,3 a	633,3 b
ANA 20 mg L ⁻¹	7433,3 a	10866,7 a	690,0 a	786,6 a
TIBA 10 mg L ⁻¹	5333,3 b	9966,7 a	573,3 b	680,0 b
TIBA 20 mg L ⁻¹	6100,0 b	10966,7 a	543,3 b	676,6 b
CV(%)	16,22	8,65	13,71	11,11
89 DAPF				
Controle	2966,7 c	7366,7 b	396,6 ab	436,6 bc
ANA 10 mg L ⁻¹	4933,3 b	9000,0 b	426,6 a	513,3 b
ANA 20 mg L ⁻¹	7966,7 a	11233,3 a	553,3 a	636,6 a
TIBA 10 mg L ⁻¹	2666,7 c	8000,0 b	333,0 b	400,0 c
TIBA 20 mg L ⁻¹	2833,3 c	7766,7 b	270,3 b	383,3 c
CV(%)	23,08	19,16	30,06	22,43
164 DAPF				
Controle	2333,3 b	7200,0 a	180,0 a	313,3 a
ANA 10 mg L ⁻¹	3366,7 ab	7466,7 a	176,7 a	316,3 a
ANA 20 mg L ⁻¹	4100,2 a	7566,7 a	246,0 a	303,6 a
TIBA 10 mg L ⁻¹	1900,0 b	6566,0 a	170,0 b	260,0 b
TIBA 20 mg L ⁻¹	2200,1 b	7000,7 a	153,3 b	273,3 b
CV(%)	30,40	12,58	20,21	9,08

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem pelo teste LSD ($p < 0,05$).

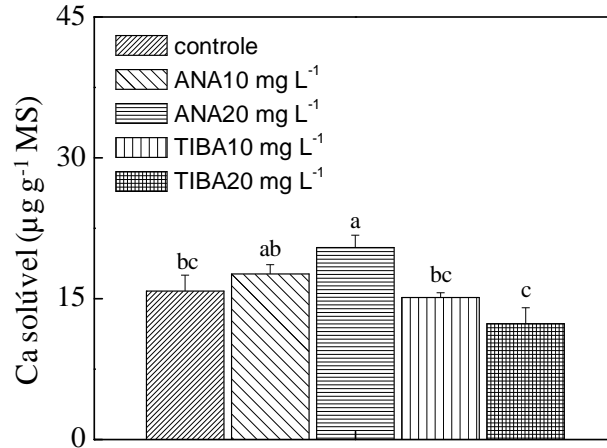


Figura 5. Cálcio solúvel total ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) na polpa, na região distal de maçãs ‘Braeburn’, quantificado aos 164 dias após a plena floração (DAPF). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$). Barras verticais indicam o erro padrão da média.

Frutos de plantas tratadas com ANA tiveram baixa atividade da PME no tecido da polpa em relação ao TIBA (Figura 6). A aplicação de auxina em frutos imaturos pode manter os níveis de auxina nos frutos elevados, retardando o processo de maturação, pela supressão e/ou redução na síntese de etileno e menor atividade da enzima PME. Apesar de muitos trabalhos relatarem diferentes efeitos da auxina sobre a síntese de etileno, amadurecimento e atividade da PME em frutos, em morangos o tratamento com auxina retardou o acúmulo de antocianinas e reduziu a expressão de FaPG1 (diminuindo a atividade da poligalacturonase) e a atividade da PME (VILLARREAL et al., 2008). Dessa forma, a aplicação do TIBA pode ter ocasionado uma redução na concentração de auxina nos frutos, permitindo que o etileno desencadeasse processos de maturação, elevando a síntese e a expressão de enzimas relacionadas ao amadurecimento (poligalacturonase e PME). A PME promove uma desmetilação das pectinas, criando novos sítios de ligação do Ca à parede celular, reduzindo os níveis de Ca apoplástico e aumentando a permeabilidade de membrana (FREITAS et al., 2012), predispondo a ocorrência do BP nos frutos.

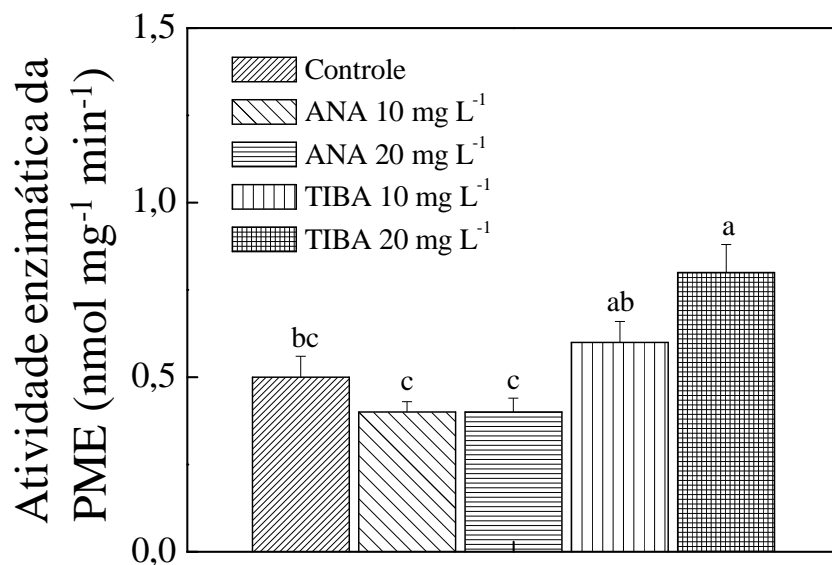


Figura 6. Atividade enzimática da pectinametilesterase (PME) na polpa região distal dos frutos de maçãs ‘Braeburn’ aos 164 DAPF. Barras verticais indicam o erro padrão da média e letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).

A análise da expressão dos genes para as proteínas envolvidas no transporte de Ca para o interior das organelas mostrou que a aplicação de TIBA aumentou a expressão da H^+ -PPase em comparação aos tratamentos com ANA (Figura 7). Para a CAX2, os frutos tratados com TIBA 20 mg L⁻¹ exibiram aumento de ~ 51% no nível de expressão em relação aos tratamentos ANA 10 e 20 mg L⁻¹ (Figura 7). Já a expressão de CAX3, *CaATPase 1* e *CaATPase 2* e *V-ATPase* na polpa dos frutos foi similar para todos os tratamentos (dados não apresentados). Esses resultados sugerem que a aplicação de TIBA pode provocar alterações no balanço auxinas/giberelinas no interior dos frutos. O maior efeito das giberelinas sobreposto ao da auxina pode ter induzido maior expressão da CAX2 e H^+ -PPase em frutos tratados com TIBA. A habilidade das giberelinas em aumentar a expressão das CAXs e H^+ -PPase também foi constatada em tomates (FREITAS et al., 2012). A atividade da H^+ -PPase contribui para a formação de um gradiente eletroquímico entre o citossol e o compartimento interno das organelas, que é requerida pelas proteínas CAX para mover o Ca para dentro do vacúolo (FREITAS et al., 2010). Dessa forma, nossos resultados indicam que a maior atividade da H^+ -PPase, associado a atividade das proteínas CAX, aumentaram o movimento do Ca para o

interior do vacúolo e alteraram a homeostase do Ca, tornando os frutos tratados com TIBA mais suscetíveis a ocorrência de BP.

Os tratamentos com ANA causaram redução na incidência de BP superior a 73%, em comparação aos tratamentos com TIBA (Figura 8). As auxinas são reguladores de crescimento conhecidos por induzir expansão celular e diferenciação de xilemas no fruto, conforme já citados anteriormente. O tratamento com ANA 20 mg L⁻¹ ocasionou aumento na massa fresca dos frutos na colheita comercial (164 DAPF) em relação ao tratamento TIBA 20 mg L⁻¹ (Figura 2), o que poderia ocasionar diluição na concentração de Ca nos frutos, e assim aumentar a incidência de BP. No entanto, nossos resultados revelaram que as concentrações de auxinas nas concentrações 10 e 20 mg L⁻¹ podem aumentar o aporte de Ca para os frutos, ao manter e/ou aumentar a funcionalidade do xilema e reduzir potencialmente os movimentos do Ca para dentro das organelas, resultando em elevados níveis de Ca solúvel no apoplasto. As auxinas também podem diminuir os sítios de ligação do Ca a parede celular, em função da redução da atividade da PME, e assim elevar os níveis de Ca solúvel e reduzir a incidência de BP. Dessa forma, a ocorrência do BP em maçãs está potencialmente ligada a redução da biossíntese e aos níveis endógenos de auxina nos frutos.

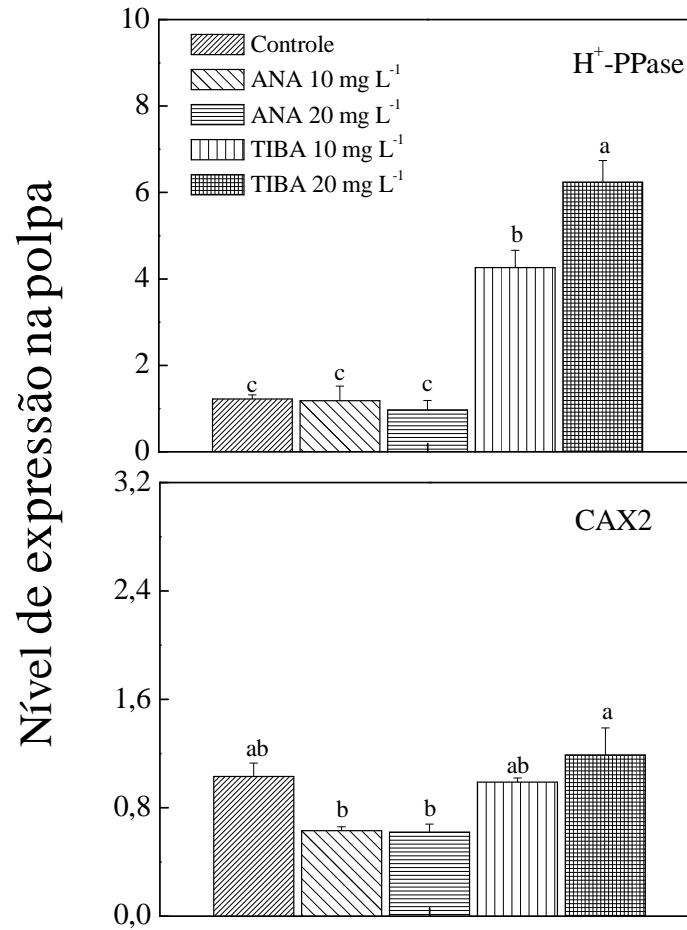


Figura 7. Expressão de genes que codificam para os transportadores CAX/H⁺ e H⁺-PPase na polpa, região distal, dos frutos em maçãs ‘Braeburn’ aos 164 DAPF. Barras verticais indicam o erro padrão da média e letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).

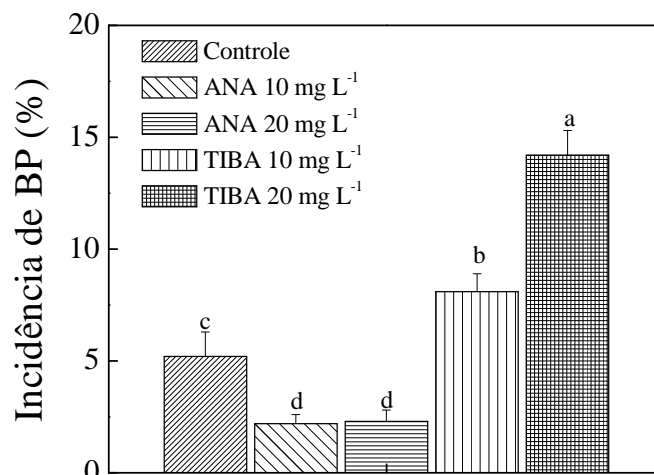


Figura 8. Incidência de “bitter pit” (BP) em maçãs ‘Braeburn’ após dois meses de armazenamento. Barras verticais indicam o erro padrão da média e letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas pelo teste LSD ($p < 0,05$).

1.4. - CONCLUSÃO

As auxinas reduzem a incidência de BP em maçã 'Braeburn' pelo aumento do aporte de Ca em função da manutenção dos feixes vasculares dos xilemas e pela redução da concentração de Ca complexado no interior das organelas e na parede celular. Por outro lado, o TIBA leva a um antecipado comprometimento dos vasos do xilema e reduz os níveis de Ca nos tecidos, especialmente de Ca solúvel no apoplasto, devido ao aumento da expressão dos transportadores CAX2 e H^+ -PPase e da atividade da PME, acarretando maior incidência de BP nos frutos.

1.5. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC (Ed.). **Automated method for microchemical determination of carbon, hydrogen, and nitrogen.** In: Official Methods of Analysis of AOAC International, 18. AOAC International, Gaithersburg, MD, 2006.

AMARANTE, C.V.T.; CHAVES, D.V.; ERNANI, P.R. Composição mineral e severidade de “bitter pit” em maçãs ‘Catarina’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 51-54, 2006.

- BANUELOS, G.S.; BANGERTH, F.; MARSCHNER H. Relationship between polar basipetal auxin transport and acropetal Ca transport into tomato fruits. **Physiol Plantarum**, v. 7, p. 321-327, 1987.
- BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society A**, v. 160, p. 268-282, 1937.
- BASSO, C. Distúrbios fisiológicos. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis, 2002. p. 609-636.
- CUTTING, J.G.M.; BOWER, J.P. The relationship between basipetal auxin transport a calcium allocation in vegetative and reproductive flushes in Avocado. **Science Horticulture**, v. 41, p. 27-34, 1989.
- DEVOGHALAERE, F.; DOUCEN, T.; GUITTON, B.; KEELING, J.; PAYNE, W.; LING, T.J.; ROSS, J.J.; HALLETT, I.C.; GUNASEELAN, K.; DAYATILAKE, G.A.; DIAK, R.; BREEN, K.C.; TUSTIN, D.S.; COSTES, E.; CHAGNÉ, D.; SCHAFFER, R.J.; DAVID, K.M. A genomics approach to understanding the role of auxin in apple (*Malus x domestica*) fruit size control. **Plant Biology**, v. 12, p. 2-15, 2012.
- DRAŽETA, L.; LANGA, A.; CAPPELLINIA, C.; HALLA, A.J.; VOLZC, R.K.; JAMESONB, P.E. Vessel differentiation in the pedicel of apple and the effects of auxin transport inhibition. **Physiologia Plantarum**, v.120, p.162-170, 2004.
- FERGUSON, I.B.; WATKINS, C.B. Bitter-pit in apple fruit. **Horticultural Reviews**, v. 11, p. 289-355, 1989.
- FREITAS, S.T DE; HANDA, A.K.; WU, Q.; PARK, S.; MITCHAM, S. Role of pectin methylesterases in cellular calcium distribution and blossom-end rot development in tomato fruit. **The Plant Journal**, v. 71, p. 824-835, 2012.
- FREITAS, S.T. de; AMARANTE, C.V.T. do; LABAVITCH, J.M.; MITCHAM, E.J. Cellular approach to understand bitter pit development in apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 6-13, 2010.
- GUARDIOLA, J.L. Synthetic auxins and citrus fruit size. Strategies of use and mechanism of action. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v. 2, p. 79-86, 1996.
- HAGERMAN, A. E.; AUSTIN, P. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 440-444, 1986.
- JACOBS, W.P. The role of auxin in differentiation of xylem around a wound. **American Journal of Botany**, v. 39, p. 301-309, 1952.

- JOHNSON, C.M.; ULRICH, A. **Analytical Methods for Use in Plant Analysis**. Bulletin 766. Agricultural Experiment Station, University of California, Berkeley, CA, 1959. 56 p.
- KŘEČEK, P.; SKUPA, P.; LIBUS, J.; NARAMOTO, S.; TEJOS, R.; FRIML, J.; ZAŽÍMALOVÁ, E. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. **Genome Biology**, v.10, p. 249.3-249.11, 2009.
- MATTSSON, J.; CKURSHUMOVA, W.; BERLETH, T. Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development. **Plant Physiology**, v. 131, p. 1327-1339, 2003.
- MEYER, G.A.; KELIHER, P.N. An overview of analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. In: MONTASER, A., GOLIGHTLY, D.W. (Eds.), **Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry**, VCH Publishers, New York, NY, 1992. v. 2. p. 473-516.
- MIQUELOTO, A.; AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.A.; SANTOS, A.; MITCHAM, E. Relationship between xylem functionality, calcium content and the incidence of bitter pit in apple fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 319-323, 2014.
- NACHTIGALL, G.R.; DECHEN, A.R. Seasonality of nutrients in leaves and fruits of apple trees. **Scientia Agricola**, v. 63, p. 493-501, 2006.
- PHILIPPAR, K.; FUCHS, I.; LÜTHEN, H.; HOTH, S.; BAUER, C.S.; HAGA, K.; THIEL, G.; LJUNG, K.; SANDBERG, G.; BÖTTGER, M.; BECKER, D.; HEDRICH, R. Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. **PNAS**, v. 96, p. 12186-12191, 1999.
- SAS INSTITUTE. **Getting started with the SAS learning edition**. Cary: SAS, 2009. 200 p.
- SORCE, C.; LOMBARDI, L.; REMORINI, D.; MONTANARO, G. Occurrence of natural auxin and accumulation of calcium during early fruit development in kiwifruit. **Australian Journal Crop Science**, v. 7, p. 895-898, 2011.
- SHAPIRO S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Bometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.
- STAHLY, E.A.; BENSON, N.R. Calcium levels of "Golden Delicious" apples sprayed with 2,3,5-Triidobenzoic acid. **Journal of American Horticulture Science**, v. 95, p. 726-727, 1970.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 793 p.

- VILLARREAL, N.M.; ROSLI, H.G.; MARTINEZ, G.S.; CIVELLO, P.M. Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p. 141-150, 2008.
- WAREING, P. F.; HANNEY, C.E.A.; DIGBY, J. The role of endogenous hormones in cambial activity and xylem differentiation. In: ZIMMERMANN, M. H. **The formation of wood in forest trees**. New York, Academic Press, 1964, p. 323-44.
- WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, v. 92, p. 487-511, 2003.

CAPÍTULO II

Ação do ácido naftaleno acético e do inibidor de auxina ácido 2,3,5-triidobenzóico sobre os atributos físicos-químicos e a ocorrência de “bitter pit” em maçãs 'Braeburn'

RESUMO

MIQUELOTO, Aquidauana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2014. **Ação do ácido naftaleno acético e do inibidor de auxina ácido 2,3,5-triidobenzóico sobre os atributos físico-químicos e a ocorrência de “bitter pit” em maçãs 'Braeburn'**. Orientador: Fernando Luiz Finger e coorientador: Cassandro Vidal Talamini do Amarante

Esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da aplicação de ácido naftaleno acético (ANA) e do inibidor de transporte de auxina ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA), sobre os atributos físico-químicos e a ocorrência de “bitter pit” (BP) em maçãs ‘Braeburn’. Macieiras ‘Braeburn’ foram pulverizadas com duas concentrações de ANA (10 e 20 mg L⁻¹) e TIBA (10 e 20 mg L⁻¹), além do tratamento controle (pulverização com água destilada). As aplicações foram realizadas semanalmente, durante o período de 50 a 106 dias após a plena floração (DAPF). Os frutos foram colhidos aos 164 DAPF e armazenadas em atmosfera do ar a 1°C e UR 90-95%, por dois meses. Frutos das plantas tratadas com ANA 10 e 20 mg L⁻¹ apresentaram redução de ~ 21 e ~ 23% nas taxas respiratórias e de ~ 21 e ~ 36% na produção de etileno, respectivamente, assim como menor coloração vermelha da epiderme, em relação aos frutos tratados com TIBA 10 e 20 mg L⁻¹. Plantas tratadas com ANA 20 mg L⁻¹ apresentaram frutos com maior acidez titulável e teor de sólidos solúveis do que nos demais tratamentos. Além disso, os frutos das plantas tratadas com ANA, apresentaram maiores valores de Ca solúvel total, o que contribui para a manutenção da integridade da membrana plasmática e redução na incidência e severidade de BP. O tratamento com ANA contribui para a manutenção na qualidade dos frutos e reduz a ocorrência de BP em maçãs.

Palavras-chave: *Malus domestica*, qualidade, distúrbio fisiológico, cálcio.

ABSTRACT

MIQUELOTO, Aquidauana, D.Sc., Federal University of Viçosa, December, 2014.
Action of naphthaleneacetic acid and auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid on physical-chemical attributes and bitter pit occurrence in 'Braeburn' apples.
Adviser: Fernando Luiz Finger and co-adviser: Cassandro Vidal Talamini do Amarante

The aim of this study was to evaluate the effect of naphthaleneacetic acid (NAA) and auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) on the physical-chemical attributes and bitter pit incidence in 'Braeburn' apples. 'Braeburn' apple trees were sprayed with two concentrations of NAA (10 and 20 mg L⁻¹) and TIBA (10 and 20 mg L⁻¹). The control plants were sprayed with distilled water. The apple trees were sprayed weekly, during the season from 50-106 days after full bloom (DAFB). The fruits were harvested at 164 DAFB and stored in cold storage at 1°C and RH 90-95% for two months. Fruit from NAA 10 and 20 mg L⁻¹ treated plants showed a reduction in respiration rate by ~ 21% and ~ 23%, and the ethylene production by ~ 21% and ~ 36%. The NAA treated fruit had lower red coloration than TIBA. NAA 20 mg L⁻¹ treated fruit had higher titratable acidity and soluble solids, compared to the other treatments. Furthermore, NAA-treated fruit had higher levels of total soluble Ca content that contributed to better membrane integrity and decreased the incidence and severity of bitter pit. NAA treatment maintains fruit quality and reduces fruit susceptibility to bitter pit.

Keywords: *Malus domestica*, quality, physiological disorder, calcium.

2.1. - INTRODUÇÃO

A cultura da macieira é de grande importância para o panorama econômico mundial. Contudo, essa cultura apresenta elevadas perdas pós-colheita de frutos, ocasionadas por diversos fatores, incluindo agentes patogênicos, alterações fisiológicas e distúrbios fisiológicos. As alterações fisiológicas ocasionam perdas relacionadas principalmente com a elevação das taxas respiratórias e de produção de etileno, redução na massa e amaciamento dos tecidos dos frutos. Os distúrbios fisiológicos são alterações de origem abiótica, decorrentes de modificações no metabolismo normal ou na integridade estrutural dos seus tecidos. Entre os vários distúrbios fisiológicos, o “bitter pit” (BP) merece destaque, em maçãs ‘Honeycrisp’ foram constatadas incidências de até 50% nos Estados Unidos durante a colheita e armazenamento e que proporcionam elevadas perdas (ROSENBERGER et al., 2001) já na região Sul do Brasil esse distúrbio pode ocasionar até 30% de perdas em pós-colheita de maçãs (BASSO, 2002).

A adoção de técnicas de cultivo e o uso de reguladores de crescimento que reduzam a ocorrência de BP podem contribuir para a conservação da qualidade e redução das perdas pós-colheita em maçãs. Os reguladores de crescimento são mensageiros químicos, necessários em pequenas quantidades nas plantas (TUAN e CHUNG-RUEY, 2013), e que podem promover mudanças nas características fisiológicas e bioquímicas das plantas e dos frutos.

Entre os reguladores de crescimento, a auxina constitui de uma alternativa promissora para a conservação da qualidade dos frutos e redução da incidência de BP. Estudos prévios demonstraram que a aplicação de auxina, durante o segundo estágio de desenvolvimento dos frutos, induziu o crescimento e aumentou a quantidade de antioxidantes e a qualidade nutricional das bagas de uva (CONSTANTINI et al., 2007). Também, a aplicação da auxina sintética sob a formulação de ácido 3,5,6-tricloro-2-piridil-oxiacético, na segunda e quarta semanas que antecederam a colheita de maçãs das cultivares Delicious e Jonathan, mantiveram a qualidade dos frutos por um maior período, durante o armazenamento (STERN e BEN-ARIE, 2008). Por outro lado, a aplicação de inibidores de auxina, como o ácido 2,3,5-triiodobenzóico (TIBA), afetaram o aporte de Ca para os frutos, pela inibição do movimento basípeto do ácido indol acético. Adicionalmente promoveram alterações na acidez e nos teores de sólidos

solúveis, reduziram a massa fresca e a concentração de Ca total, porém não alteraram as concentrações de K e Mg em kiwis (BUXTON, 2005).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da aplicação de ANA e do inibidor de transporte de auxina TIBA, sobre os atributos de qualidade e na ocorrência de BP em maçãs 'Braeburn'.

2.2. - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em um pomar comercial de macieiras 'Braeburn' com 10 anos de idade, conduzidas com líder central, em sistema de média densidade, com espaçamento de 2,0 m × 6,0 m, localizado no município de Clarksburg, Califórnia, EUA, (38° 21'23,27"N, 121°32'13,62"O e altitude de 123 m).

Os tratamentos foram constituídos de duas concentrações de ANA (10 e 20 mg L⁻¹) e TIBA (10 e 20 mg L⁻¹), além de um tratamento controle (plantas pulverizadas com água destilada). Os tratamentos foram aplicados com um atomizador costal (Kawashima, KWS 8020), a cada sete dias, durante o período de 50 a 106 dias após a plena floração (DAPF), utilizando um volume de calda de 1000 L ha⁻¹. O delineamento experimental utilizado foi em blocos com parcelas casualizadas, com cinco tratamentos e seis repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta.

Os frutos foram colhidos aos 164 dias DAPF (maturação comercial), transportados ao laboratório, onde foram selecionados (eliminando-se aqueles com defeitos ou com dano mecânico), homogeneizados e separados nas unidades experimentais (frutos por repetição /bloco). Em seguida, os frutos foram armazenados em atmosfera do ar (AR) a 1 °C e UR 90-95%, por um período de dois meses.

Após o período de armazenamento, seguidos de dois dias a temperatura ambiente (25 °C e UR 55-60%), os frutos foram avaliados quanto as taxas respiratórias e de produção de etileno, acidez titulável (AT), sólido solúveis (SS), pH, firmeza de polpa (N), cor da epiderme (*L* e *h*°), concentração de Ca solúvel total no tecido da polpa da região distal do fruto, incidência e severidade de BP. Cada tratamento foi constituído por seis repetições, sendo cada unidade experimental constituída de 20 frutos. As taxas respiratórias e de produção de etileno foram quantificadas, colocando-se 10 frutos de

cada amostra em um recipiente hermético, com o volume de 2,3 L. A taxa respiratória foi obtida pela diferença de concentração de CO₂ no interior do recipiente, imediatamente após o seu fechamento e depois de uma hora. Alíquotas de gás (1 mL) foram retiradas dos recipientes por meio de um septo de borracha e injetadas em um cromatógrafo à gás (Carle[®], modelo 211, CA, EUA), equipado com uma coluna Porapak N[®] de 3 m de comprimento (80-100 mesh), metanador e detector de ionização de chama. As temperaturas da coluna, detector, metanador e injetor foram de 45 °C, 120 °C, 300 °C e 110 °C, respectivamente. Os fluxos de nitrogênio, hidrogênio e ar sintético foram de 70, 30 e 300 mL minuto⁻¹, respectivamente. Os valores da atividade respiratória (ml de CO₂ kg⁻¹ h⁻¹) e da taxa de produção de etileno (µL de C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹) foram calculados pela fórmula proposta por Banks et al. (1995).

Os valores de AT (% de ácido málico) foram obtidos por meio de uma amostra de 1g de suco diluída em 10 mL de água destilada e titulada com solução de NaOH 0,1 N até pH 8,1, com auxílio de um titulador automático (TIM850 Titration Manager, USA). Os teores de SS (°Brix) foram determinados com um refratômetro digital (Reichert ARG series).

A cor da epiderme foi avaliada através dos parâmetros *L* (lightness) e *h*[°] (ângulo 'hue'), com um colorímetro Minolta, modelo CR 400, sendo as leituras realizadas em dois lados do fruto. O *L* permite detectar as tonalidades da cor (valores baixos correspondem à coloração escura e valores altos à coloração clara da epiderme do fruto) e o *h*[°] define a coloração básica, sendo que 0° = vermelho, 90° = amarelo e 180° = verde.

A concentração de Ca solúvel total foi determinada na polpa, na seção distal dos frutos. Para isso, utilizou-se 0,5 cm da polpa localizada logo abaixo da casca de 10 frutos (amostra de ~ 70g), onde foi extraído o suco com auxílio de um processador manual. O teor de Ca solúvel total foi quantificado em um espectrofotômetro de plasma induzido por argônio (ICP/OES) (MEYER e KELIHER, 1992)

Antes do armazenamento foi quantificado o extravazamento de eletrólitos para cada tratamento, com o objetivo de determinar o grau de permeabilidade de membrana. O extravazamento de eletrólitos foi determinado na região distal da polpa de frutos, coletados aos 164 DAPF. Para isso, foram utilizadas seis repetições, sendo cada

repetição constituída de três frutos. O tecido da casca da região distal (profundidade de 1 mm) foi removido e descartado. Com a utilização de um extravazador metálico de 11 mm de diâmetro, foram removidos dos frutos 12 cilindros da polpa com 1 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura. Os cilindros foram lavados durante 30 segundos com água desionizada, e em seguida acondicionados em tubos falcon contendo 30 mL de uma solução de manitol ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), mantidos a temperatura de 25°C (banho-maria). As leituras para a quantidade de eletrólitos extravasados foram realizadas após 1/2, 2, 3 e 4 horas, com o auxílio de um condutivímetro (Fischer Scientific, 1993). Depois da última leitura (4 horas), os cilindros foram retirados da solução de manitol e armazenadas a -20°C por 24 horas. Após, os cilindros foram descongelados por aproximadamente 50 minutos a temperatura ambiente e avaliado a sua condutividade. Os valores foram expressos em porcentagem de condutividade, conforme proposto por Saltveit (2002).

Para a determinação da incidência de BP, os frutos foram avaliados quanto à presença ou ausência de distúrbio e os resultados expressos em porcentagem (%). A severidade de BP (manchas fruto⁻¹) foi determinada por meio da utilização de uma escala, variando de 0 a 6 (0 - ausência de manchas, 1 - uma mancha, 2 - duas manchas, 3 - três manchas, 4 - quatro manchas, 5 - cinco manchas e 6 - presença de 6 ou mais manchas).

Para as análises físico-químicas, a amostra foi constituída de 20 frutos. Para avaliação da incidência e severidade de BP, cada tratamento continha seis repetições, sendo cada unidade experimental constituída de 100 frutos.

Os dados obtidos nos diferentes tratamentos foram inicialmente submetidos ao teste de Bartlett (BARTLETT, 1937), para verificar a homogeneidade das variâncias, e ao teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO e WILK, 1965), para verificar a normalidade dos resíduos. Satisfeitas as pressuposições do modelo normal, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as mesmas comparadas pelo teste LSD ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas no software estatístico SAS, versão 9.1 (SAS INSTITUTE, 2009).

2.3. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes do armazenamento foi realizada a análise inicial de seis amostras de 10 frutos, para determinar as características de qualidade inicial. Maçãs ‘Braeburn’ submetidas aos tratamentos controle, ANA 10 e 20 mg L⁻¹ e TIBA 10 e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, firmeza de polpa de 75,2; 72,0; 69,4; 70,7 e 70,3 ; teor de sólidos solúveis (SS) de 12,2; 11,8; 11,1; 12,3 e 12,6 %; acidez titulável (AT) de 0,3; 0,4; 0,4; 0,3 e 0,3% de ácido málico; e índice de iodo-amido (escala de 1-5) de 3,4; 3,7; 3,8; 3,8 e 4,1 (Tabela 1).

Após dois meses de armazenamento, os frutos das plantas tratadas com ANA 10 e 20 mg L⁻¹ apresentaram redução de ~ 21 e ~ 23% nas taxas respiratórias, e de ~ 25 e ~ 37% na produção de etileno, em relação aos frutos das plantas tratadas com TIBA (Tabela 2).

O decréscimo na taxa respiratória em frutos das plantas tratadas com ANA pode ser atribuído a redução no nível de expressão de genes que estão envolvidos no metabolismo dos açúcares. Böttcher e Davies (2012) verificaram que bagas de uva tratadas com ácido benzotiazole 2-oxiacético (uma auxina sintética), exibiram redução na concentração de hexoses em função da redução do nível de expressão dos genes relacionados ao metabolismo dos açúcares. A redução na respiração observada em maçãs das plantas tratadas com ANA, provavelmente ocorreu em função do menor aporte de substratos respiratórios, como consequência da menor expressão de genes que codificam para algumas enzimas do metabolismo dos carboidratos, como sacarose sintase. As auxinas, quando aplicadas em estágios iniciais do desenvolvimento dos frutos, tendem a retardar a maturação, decorrente da menor produção de etileno nos frutos. Bötcher et al. (2011) verificaram que o efeito da auxina sobre a rota de biossíntese de etileno é dependente do período de desenvolvimento do fruto em que esse regulador de crescimento é aplicado. A aplicação de auxina nos estágios iniciais de desenvolvimento de frutos de kiwi proporcionaram menor produção de etileno, decorrente do reduzido nível de expressão de genes que codificam para oxidase do ACC, retardando o processo de maturação dos frutos (FABRONNI et al., 2006). Além disso, as auxinas podem interferir na expressão de genes que codificam para sintase do ACC

(FABRONNI et al., 2006). O etileno é formado inicialmente pela transformação do S-adenosil L-metionina em ácido aminociclopropano 1-carboxílico (ACC), pela sintase do ACC, e esse é convertido a etileno pela oxidase do ACC (ALEXANDER e GRIERSON, 2002). Dessa forma, a auxina pode reduzir a produção de etileno em função de reduzir o nível de expressão dos genes que codificam para sintase do ACC e oxidase do ACC, enzimas chaves da rota de biossíntese do etileno.

A aplicação de 20 mg L⁻¹ de ANA elevou a AT, mas não alterou o pH (dados não apresentados), e nem modificou a firmeza dos frutos quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 2).

Os níveis mais elevados de AT em frutos tratados com ANA (Tabela 2) podem ser atribuídos ao menor consumo de ácidos orgânicos na respiração. Segundo Bötcher e Davies (2012), em trabalho realizado com uva, observaram níveis mais elevados de ácido málico em frutos tratados com ANA, sugerindo que a auxinas retardaram o processo de maturação dos frutos. Além disso, valores mais elevados de AT em frutos tratados com auxina podem ser explicados em função de que esse regulador de crescimento pode interferir sobre a expressão de genes e ou atividade da enzima málica dependente de NADP. Esta enzima é responsável pela descarboxilação do malato a piruvato, substrato utilizado no Ciclo de Krebs (SOGLIO et al., 2009). Esses autores também observaram que o aumento nas taxas respiratórias aumentava o nível transcricional para enzima málica dependente de NADP, e que o inverso também foi verdadeiro. Dessa forma, como auxina reduziu a respiração podemos inferir que pode ter ocorrido um menor nível transcricional e/ou menor atividade para enzima málica dependente de NADP, o que contribui para a manutenção dos níveis mais elevados de AT nos frutos tratados com ANA.

O teor de SS é considerado um importante parâmetro de qualidade para avaliação de maçãs. Os frutos das plantas que receberam aplicação de auxina na maior concentração (20 mg L⁻¹) exibiram maior teor de SS do que no tratamento controle (Tabela 2). Em hipótese, o maior teor de SS verificado nesses frutos tratados com ANA 20 mg L⁻¹ pode ser atribuído as menores taxas respiratórias que reduziram o consumo de açúcares e ácidos orgânicos. Resultados semelhantes foram reportados por Tuan e

Chung-Ruey (2013), que verificaram aumento nos teores de SS em maçãs com a aplicação de auxina sintética.

Os frutos das plantas tratadas com ANA (10 e 20 mg L⁻¹) apresentaram maiores valores de h° no lado vermelho em comparação ao frutos tratados com TIBA, que não diferiram do controle (Tabela 3). Os maiores valores de L foram obtidos em frutos tratados com ANA e TIBA, indicando uma coloração mais clara da epiderme (Tabela 3). Por outro lado, os valores de L na região do fruto exposta a radiação solar (lado mais vermelho) e h° na região menos exposta a radiação solar (mais verde dos frutos), não diferiram entre os tratamentos (Tabela 3).

Frutos tratados com auxina tiveram menor coloração vermelha da epiderme (maiores valores de h°) na região mais exposta à radiação solar. A coloração vermelha da epiderme está relacionada principalmente à biossíntese de antocianinas na presença de luz (SHAHIDI e NACZK, 2004). Estudos prévios demonstraram que aplicações de ácido benzotiazole 2-oxiacético (uma auxina sintética), reduziram a taxa de acumulação de antocianinas na epiderme de amoras, devido à redução e ao retardamento dos níveis de expressão de genes que codificam para chalcona sintase (DAVIES et al., 1997). Essa enzima participa da rota de biossíntese das antocianinas, sendo responsável pela conversão de 4-coumaroil-CoA a chalcona, e tendo como produto final a síntese de antocianinas (JEONG et al., 2004). Dessa forma, nossos resultados parecem indicar que a menor coloração vermelha na epiderme dos frutos tratados com auxina pode estar relacionada à redução no nível transcricional para chalcona sintase, que contribui para o retardamento no processo de maturação dos frutos.

Os frutos tratados com ANA tiveram baixa permeabilidade de membrana aos 164 DAPF (Figura 1) e menor incidência e severidade de BP após dois meses de armazenamento refrigerado do que nos tratamentos com TIBA (Tabela 3). Além disso, o Ca solúvel total nos frutos das plantas pulverizadas com ANA 20 mg L⁻¹ foi ~ 38% superior em comparação ao TIBA 10 e 20 mg L⁻¹ e o controle, e não diferindo do ANA 10 mg L⁻¹ (Tabela 2).

A aplicação de auxina nas plantas com frutos imaturos retardou o processo de maturação, pela redução da síntese de etileno, que pode ter ocasionado redução no nível de expressão e atividade da PME. Verma et al. (2014) verificaram em bananas uma

redução no nível transcricional da PME em frutos com retardo na maturação e com baixa produção de etileno. Dessa forma, a redução na produção de etileno pode ter ocasionado uma menor expressão de genes que codificam para a PME, o que pode ter contribuído para a manutenção dos níveis elevados de Ca solúvel total, principalmente no apoplasto da célula. A PME é uma enzima que tem por função remover os grupamentos metil-éster, criando novos sítios de ligação do Ca na parede celular, reduzindo os níveis de Ca apoplástico e aumentando a permeabilidade da membrana, predispondo os frutos a ocorrência de distúrbios fisiológicos, como o BP (FREITAS et al., 2012). Além disso, os elevados conteúdos de Ca solúvel total em frutos expostos a ação de auxina podem ser atribuídos a menor expressão de genes que codificam para expressão de bombas eletrogênicas e transportadores de Ca. As bombas eletrogênicas são responsáveis pela formação de um gradiente eletroquímico entre o citossol e o compartimento interno das organelas, o qual é requerido pelas proteínas transportadores de Ca para mover o Ca para dentro do vacúolo. Dessa forma, uma menor expressão para as bombas eletrogênicas e transportadores de Ca reduziria o movimento do Ca para o interior do vacúolo e contribuiria para a manutenção dos níveis elevados de Ca solúvel, principalmente no apoplasto, e para a manutenção da integridade da membrana plásmatica tornando os frutos tratados com ANA menos suscetíveis a ocorrência de BP.

Nossos resultados mostraram que a pulverização de macieiras com ANA reduziu a respiração e produção de etileno e manteve os níveis de SS, o que contribui para prolongar a qualidade e a vida pós-colheita dos frutos, além da manutenção de maiores níveis de Ca solúvel resultando na redução da ocorrência de BP.

Tabela 1. Efeito de ácido naftaleno acético (ANA) e de ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) na firmeza de polpa (N), acidez titulável (AT; % de ácido málico), amido (1-5) e sólidos solúveis (SS; %) em maçãs ‘Braeburn quantificados aos 164DAPF.

Tratamento	Firmeza(N)	Ácido málico (%)	Amido (1-5)	SS (%)
Controle	75,2 a	0.3 ab	3.4 b	12.2 ab
ANA 10 mg L ⁻¹	69,4 b	0.4 a	3.7 ab	11.8 b
ANA 20 mg L ⁻¹	72,0 ab	0.4 a	3.8 ab	11.1 c
TIBA 10 mg L ⁻¹	70,7 ab	0.3 b	3.8 ab	12.3 ab
TIBA 20 mg L ⁻¹	70,3 ab	0.3 b	4.1 a	12.6 a
CV (%)	5.1	19.9	8.7	5.4

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Tabela 2. Efeito de ácido naftaleno acético (ANA) e de ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) na respiração e produção de etileno, firmeza de polpa (N), acidez titulável (AT; % de ácido málico) e sólidos solúveis (SS; %) em maçãs 'Braeburn' armazenadas por dois meses em atmosfera do ar (1°C e UR de 90-95%), seguido de dois dias de exposição a temperatura ambiente (25°C e UR de 55-60%).

Tratamentos	Respiração (ml CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)	Etileno (µL etileno kg ⁻¹ h ⁻¹)	Firmeza de polpa (N)	AT (% ácido málico)	SS (%)
Controle	978,4 ab	31,8 a	56,84 a	0,36 bc	9,65 b
ANA 10 mg L ⁻¹	782,9 b	21,4 c	53,25 a	0,40 b	10,52 ab
ANA 20 mg L ⁻¹	773,7 b	17,6 c	52,44 a	0,46 a	11,40 a
TIBA 10 mg L ⁻¹	962,9 ab	25,8 ab	54,12 a	0,35 bc	10,53 ab
TIBA 20 mg L ⁻¹	1037,9 a	31,9 a	53,82 a	0,34 c	10,65 ab
CV (%)	18,6	28,9	5,2	14,9	10,01

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste LSD (p < 0,05).

Tabela 3. Coloração da casca (atributos *L* e *h*^o) nos lados mais e menos expostos a radiação solar, Ca solúvel total e severidade e incidência de “bitter pit” (BP), determinados em frutos de macieiras ‘Braeburn’ tratadas com ácido naftaleno acético e ácido 2,3,5-triidobenzóico, armazenados por dois meses em atmosfera do ar (1°C e UR de 90-95%), seguido de dois dias de exposição a temperatura ambiente (25°C e UR de 55-60%).

Tratamentos	Lado mais exposto à		Lado menos exposto à		Ca solúvel total (µg g ⁻¹)	Severidade de BP (0-6)	Incidência de BP (%)
	radiação solar		radiação solar				
	<i>L</i>	<i>h</i> ^o	<i>L</i>	<i>h</i> ^o			
Controle	48,9 a	53,5 ab	69,2 c	99,8 a	13,8 bc	12,1 a	5,2 c
ANA 10 mg L ⁻¹	53,5 a	55,7 a	71,7 b	101,5 a	17,6 ab	2,4 b	2,2 d
ANA 20 mg L ⁻¹	54,4 a	56,4 a	73,2 ab	101,9 a	19,6 a	3,4 b	2,3 d
TIBA 10 mg L ⁻¹	50,2 a	46,4 b	72,3 ab	101,8 a	13,1 bc	13,0 a	8,1 b
TIBA 20 mg L ⁻¹	48,3 a	44,2 b	73,2 a	102,4 a	12,1 c	15,6 a	14,2 a
CV (%)	9,1	15,1	2,8	2,4	24,7	45,8	38,2

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste LSD ($p < 0,05$).

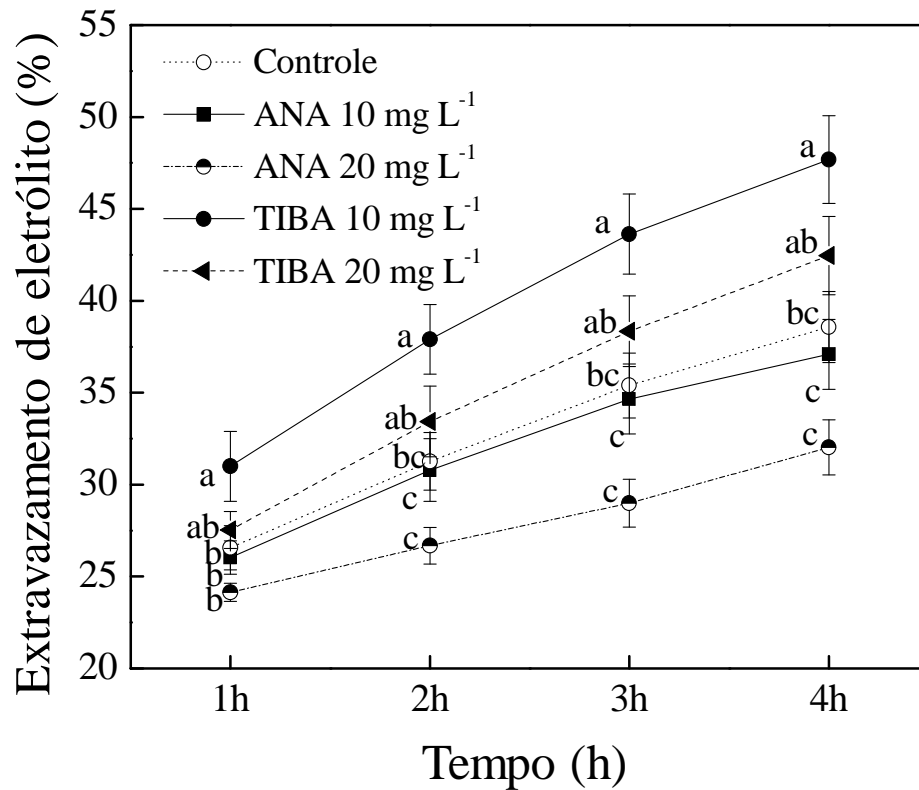


Figura 1. Extravazamento de eletrólitos na região distal de maçãs ‘Braeburn’ aos 164 DAPF. Barras com mesma letra não apresentaram diferença significativa (LSD, $p < 0,05$). Valores médios ($n = 18$) \pm erro padrão da média.

2.4. - CONCLUSÃO

A auxina ANA tem um efeito positivo sobre a qualidade dos frutos uma vez que reduz a respiração e produção de etileno, e mantém os níveis elevados de sólidos solúveis e acidez titulável, bem como contribui para redução da ocorrência de BP, visto que mantém os níveis elevados de Ca solúvel total. Por outro lado, o TIBA reduz os níveis de Ca solúvel total nos tecidos, aumentando a incidência e severidade de BP, e tem um efeito negativo sobre os atributos de qualidade do fruto.

2.5. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2039-2055, 2002.
- BANKS, N.H.; CLELAND, D.J.; CAMERON, A.C.; BEANDRY, R.M; KADER, A.A. Proposal for a rationalized system of units for postharvest research in gas exchange. **American Society for Horticultural Science**, v. 30, p. 1129- 1131, 1995.
- BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society A**, v. 160, p. 268-282, 1937.
- BASSO, C. Distúrbios fisiológicos. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis, 2002. p.609-636.
- BÖTTCHER, C.; DAVIES C. Hormonal control of grape berry development and ripening. In: Gerós, H.; Chaves, M.M.; Sharjah, S.D (Eds). **The Biochemistry of the Grape Berry**, 2012. v. 1, p. 194-217.
- BÖTTCHER, C.; BOSS, P.K.; DAVIES, C. Acyl substrate preferences of an IAA-amido synthetase account for variations in grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening caused by different auxinic compounds indicating the importance of auxin conjugation in plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 4267-4280, 2011.
- BUXTON, K.N. **Preharvest practices affecting postharvest quality of 'Hyward' kiwifruit**. Massey University, New Zeland, 2005, 288 p.
- CONSTANTINI, E.; LANDI, L., SILVESTRONI, O.; PANDOLFINI, T.; SPENA, A.; MEZETTI, B. Auxin synthesis-encoding transgene enhances grape fecundity. **Plant Physiology**, v. 143, p. 1689-1694, 2007.
- DAVIES C.; BOSS P.K.; ROBINSON S.P. Treatment of grape berries, a nonclimateric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1155-1161, 1997.
- FABBRONI, C.; COSTA, F.; BREGOLI, A.M.; COSTA, G. Effect of auxin on fruit morphogenesis: physiological and molecular aspects in kiwifruit ripening. **Acta Horticulturae**, n. 753, p. 541-547, 2006.
- FREITAS, S.T, de; JIANG, C.Z.; MITCHAM, J.E. Mechanisms involved in calcium deficiency development in tomato fruit in response to gibberellins. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 31, p. 221-234, 2012.
- JEONG, S.T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, S.; ESAKA, M. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression

- of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. **Plant Science**, v. 167, p. 247-252, 2004.
- MEYER, G.A.; KELIHER, P.N. An overview of analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. In: MONTASER, A., GOLIGHTLY, D.W. (Eds.), **Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry**, VCH Publishers, New York, NY, 1992. v. 2. p. 473-516.
- SALTVEIT, M.E. The rate of ion leakage from chilling-sensitive tissue does not immediately increase upon exposure to chilling temperatures. **Postharvest Biology Technology**, v. 26, p. 295-304, 2002.
- SAS INSTITUTE. **Getting started with the SAS learning edition**. Cary: SAS, 2009. 200 p.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004. 566 p.
- SHAPIRO S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Bometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.
- STERN, R.A.; BEN-ARIE, R. Effect of the synthetic auxin 3,5,6-TPA on pre-harvest drop, fruit quality and maturation of 'Delicious' and 'Jonathan' apples. **Acta Horticulturae**, n. 774, p. 251-258, 2008.
- SOGLIO, V.; COSTA, F.; MOLTHOFF, J.W.; WEEMEN-HENDRIKS W. M. J.; SCHOUTEN, H.J.; GIANFRANCESCHI, L. Transcription analysis of apple fruit development using cDNA microarrays. **Tree Genetics e Genomes**, v. 5, p. 685-698, 2009.
- TUAN, M.N.; CHUNG-RUEY, Y. Effect of gibberellic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on fruit development and fruit quality of wax apple. **World Academy of Science Engineering and Technology**, v. 7, p. 302-308, 2013.
- VERMA, C.; SINGH, R.K.; MISHRA, S. Biochemical characterization of pectin methylesterase from *Musa acuminata* referring to delayed ripening. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, p. 42-47, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

A auxina aplicada nas plantas em pré-colheita sobre a forma de ANA, durante os 50 aos 106 DAPF, são capazes de reduzir a incidência de BP em função de retardar a perda da funcionalidade dos elementos de vasos de xilema e reduzir a concentração de Ca complexado no interior de organelas e na parede celular, em função da baixa expressão de genes que codificam para a bomba eletrogênica H^+ -PPase e para o transportador de Ca, CAX2, na membrana do vacúolo. Além disso, as auxinas reduzem a respiração e produção de etileno e mantém elevados os teores de SS e AT, o que contribui para manutenção da qualidade dos frutos.

Por outro lado, o inibidor de auxina TIBA ocasiona um comprometimento na funcionalidade dos elementos de vaso e uma redução na concentração de Ca solúvel total, em função do aumento da expressão dos transportadores CAX2 e H^+ -PPase e da atividade da PME, levando a uma maior ocorrência de BP nos frutos. Além disso, o TIBA afeta negativamente a qualidade dos frutos.

Assim, nossos resultados demonstram que a pulverização da auxina sintética ANA em macieiras 'Braeburn' durante o desenvolvimento dos frutos pode contribuir para a redução da ocorrência desse distúrbio e para a manutenção da qualidade nos frutos.