

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE cDNAs DE MAÇÃS CV. FUJI EM
RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM OS FUNGOS *Botryosphaeria dothidea* E
Penicillium expansum E O TRATAMENTO TÉRMICO EM PÓS-COLHEITA

Adriana Regina Corrent
Engenheira Agrônoma/UFPel

Tese apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de Doutor
em Fitotecnia
Área de Concentração Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2007

" Que força é esta, eu não sei; tudo o que sei é que existe, e está disponível apenas quando alguém está num estado em que sabe exatamente o que quer, e está totalmente determinado a não desistir até conseguir."

Alexander Graham Bell

DEDICO

*Aos meus amados pais
Madalena e Luiz e aos meus
queridos irmãos Giovani,
Luciano e Sara pelo esforço
e carinho dedicados.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar sempre o meu caminho;

Aos meus pais Luiz e Madalena e aos meus irmãos Giovani, Luciano e Sara pela confiança, apoio, incentivo e carinho em todos os momentos da minha vida;

Ao professor e orientador Renar João Bender pelo incentivo e apoio durante a realização do trabalho;

Ao professor e co-orientador Marcelo Gravina de Moraes, pelo incentivo, sugestões e ensinamentos científicos e éticos;

À professora Carla Delatorre pelas sugestões e incentivo;

Às minhas irmãs de coração Ana Elisa, Andréia, Eliane e Mônica pelo apoio e amizade incondicionais;

Aos amigos, Ana Carolina, Anderson, Camila, Carlinha, Luiza, Raquel, Renata, pela companhia e boas gargalhadas;

À Ligia Loss Scharzt, pela ajuda, amizade e parceria em todas as horas;

Ao Jeferson pelo amor, carinho e apoio;

Aos amigos que mesmo distantes sempre estiveram presentes, Aline, Bárbara, Emerson, Flávia, Janaína, Juliana, Karine, Michel, Mirela, Priscila, Renato, Silvana e Vanina;

À Adélia pelo apoio;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Pós-colheita, Cândida, Rose, Sandra, Marcos, e Mario, pela ajuda e sugestões;

À Fabiola, Grasiela, e Paula pela companhia e amizade;

À família LFM, Ana Paula, André, Alex, Caren, Diego, Elis, Fernanda, Jeferson, Johannes, Leonardo, Paula, Pedro, Ricardo, Sandra, Tatiane, Vanina, pelos bons momentos compartilhados e pelo muitos cafés, e em especial, à Mônica e ao Marcos pela ajuda e contribuições no trabalho;

Aos colegas do Departamento de Horticultura e Silvicultura, em especial ao Denis pela ajuda estatística e ao Eduardo pelas sugestões, amizade e apoio;

Aos Professores do departamento de Fitossanidade e Horticultura;

Aos funcionários do Departamento de Horticultura;

Ao CNPq pelo apoio financeiro e pela bolsa;

À empresa Mercochem e Agroindustrial Lazzeri pela doação dos frutos de maçã.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE cDNAs DE MAÇÃS CV. FUJI EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM OS FUNGOS *Botryosphaeria dothidea* E *Penicillium expansum* E O TRATAMENTO TÉRMICO EM PÓS-COLHEITA.¹

Autor: Adriana Regina Corrent
Orientador: Renar João Bender
Co-orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do tratamento térmico por aspersão de água a 58°C por 30 segundos no controle das podridões em pós-colheita causadas pelos fungos *Botryosphaeria dothidea* e *Penicillium expansum* e caracterizar, em nível molecular, interações entre o patógeno *B. dothidea* e maçãs cv. Fuji, a fim de identificar o efeito do tratamento térmico na indução de genes de resistência. O primeiro trabalho desenvolvido foi o estudo de diferentes métodos de extração de RNA total de maçãs, em três estádios de maturação e em diferentes partes do tecido dos frutos. Maçãs verdes apresentam maior rendimento de RNA quando comparadas com maçãs em senescência e maduras. Dentre os tecidos estudados, a epiderme apresentou maior quantidade de RNA total. Nos trabalhos de expressão gênica diferencial o perfil de expressão de maçãs inoculadas com *B. dothidea* e não inoculadas foi comparado, através da técnica de Differential Display RT-PCR. Quatrocentos fragmentos de cDNAs diferencialmente expressos foram isolados. Destes, trinta não apresentaram similaridade com nenhuma seqüência depositada no GenBank. Quatorze seqüências foram similares a metalotioninas (Mets) do tipo 2 de *Malus domestica*. Também foram isoladas uma profilina alergênica, uma proteína de resistência CC-NBS-LRR, uma fosfatase e uma proteína hipotética SHOOT2. A incidência e a severidade da podridão branca foram reduzidas pelo tratamento térmico. O número de lesões ocasionadas por *P. expansum* foi reduzido e tamanho das lesões não sofreu influência. Já as características físico-químicas não foram alteradas pelo tratamento com calor. Foram obtidos resultados da expressão gênica através do DD-RT-PCR, porém a análise das seqüências não demonstrou nenhuma similaridade com as seqüências disponíveis no GenBank.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (136 p.) Março, 2007.

EFFECTS OF POSTHARVEST HEAT TREATMENTS ON THE CONTROL OF *Botryosphaeria dothidea* AND *Penicillium expansum* AND ON DIFFERENTIAL DISPLAY OF cDNA'S OF CV. FUJI APPLES.²

Author: Adriana Regina Corrent

Adviser: Renar João Bender

Co-adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

The present work was conducted in order to evaluate alternative methods to control postharvest decay incidence. The objective was to determine the effectiveness of heat treatments with water at 58°C for 30 seconds on postharvest control of *Botryosphaeria dothidea* and *Penicillium expansum* and to characterize at the molecular level the interactions between *B. dothidea* and cultivar Fuji apples in order to identify the effects of heat treatments on the induction of resistance related genes. In the first part of the work different RNA extraction methods of apples at different ripeness stages and from different fruit tissues were tested. Less ripe apples have higher RNA yields in comparison to riper apples. Amongst the analyzed tissues, epidermal tissues yielded highest total RNA. In the work with differential display the profiles of inoculated and not inoculated apples with *B. dothidea* were compared through DD-RT-PCR. 400 fragments of cDNA's differentially expressed were isolated. 30 fragments did not have any similarity with any of the sequences of the GenBank, 14 sequences were similar to type 2 methalothionines (Mets) of *Malus domestica*. Beyond Mets, were isolated as well an allergenic profilin, a domain of CC-NBS-LRR, a phosphatase and a protein SHOOT2. The results on gene expression and on the postharvest control of white rot and blue mold through hot water sprays at 58°C for 30s indicate that there is a reduction on the incidence and severity of white rot. Heat treatments do not affect fruit quality and lesion size of decay caused *P. expansum*, though, reduce the number of lesions on treated apples. The DD-RT-PCR technique did not result in positive identification of differentially expressed genes.

² Doctoral Thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (136 p.) March, 2007.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1.1. A Cultura da Macieira	1
1.2. Doenças em Pós-colheita de Maçãs	5
1.2.1 Podridão Branca	7
1.2.1.1 Etiologia	7
1.2.1.2 Sintomatologia	9
1.2.1.3 Ciclo da Doença.....	10
1.2.2 Mofo Azul	13
1.2.2.1 Etiologia	13
1.2.2.2 Sintomatologia	14
1.3. Controle de Doenças em Pós-Colheita	15
1.3.1 Tratamento térmico	16
1.4. Análise da expressão diferencial de genes	22
1.4.1 Isolamento de RNA de Plantas Frutíferas	28
1.5. Objetivos do Trabalho	30
CAPÍTULO II	32
2.1. Introdução	32
2.2. Materiais e métodos	35
2.2.1 Material Vegetal	35
2.2.2 Análises Físico-químicas	36
2.2.3 Método Bugos	36
2.2.4 Micro extração de RNA Concert™ Plant RNA Reagent.....	38
2.2.5 Macro extração de RNA Concert™ Plant RNA Reagente.....	39
2.2.6 Estimativa da Quantidade e Qualidade do RNA Total	40
2.2.7 RT-PCR com Oligonucleotídeos Iniciadores de Actina de Maçã	40
2.2.8 Análise dos Resultados.....	41
2.3. Resultados e discussão	42
2.3.1 Experimento 1	42

2.3.2	Experimento 2.....	48
CAPÍTULO III		57
3.1.	Introdução	57
3.2.	Materiais e métodos	59
3.2.1	Material Vegetal.....	59
3.2.2	Produção do Inóculo de <i>B. dothidea</i>	60
3.2.3	Inoculação dos Frutos.....	60
3.2.4	Isolamento de RNA.....	61
3.2.5	RT-PCR com Oligonucleotídeos Iniciadores de Actina de Maçã	61
3.2.6	Differential Display RT-PCR.....	61
3.2.7	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	63
3.2.8	Isolamento de cDNAs	64
3.2.9	Re-amplificação	64
3.2.10	Purificação de Fragmentos	65
3.2.11	Seqüenciamento.....	65
3.2.12	Análise de similaridade de seqüências	65
3.2.13	RT-PCR com Oligonucleotídeos Iniciadores Metalotionina Tipo 2.....	66
3.3.	Resultados e discussão	66
3.3.1	Metalotioninas do Tipo 2.....	71
3.3.2	Proteína de Resistência NBS-LRR-CC	73
3.3.3	Proteína Fosfatase 2C (PP2C)	76
3.3.4	Profilina Alergênica	78
CAPÍTULO IV		83
4.1.	Introdução	83
4.2.	Materiais e métodos	91
4.2.1	Material vegetal.....	91
4.2.2	Produção do Inóculo dos Fungos	91
4.2.3	Inoculação dos Frutos.....	92
4.2.4	Tratamento Térmico.....	93
4.2.5	Isolamento de RNA.....	95
4.2.6	Differential Display RT-PCR.....	96
4.2.7	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	97
4.2.8	Seqüenciamento	99
4.2.9	Análise de similaridade de seqüências	99
4.3.	Resultados e discussão	100
4.3.1	Efeito do tratamento térmico sobre a incidência e severidade da podridão branca e do mofo azul	100
4.3.2	Efeito do tratamento térmico sobre as características físico químicas dos frutos.....	104

4.3.3 Resultados da Expressão Gênica Diferencial	108
5. CONCLUSÕES	111
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
7. VITA.....	136

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1. Características do RNA total de frutos de maçã cv Fuji. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.	43
TABELA 2. Características físico-químicas de frutos de maçã. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2005.	45
TABELA 3. Características do RNA de frutos de maçã, obtidos através do Método Concert. LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2005.	45
TABELA 4. Características do RNA de maçãs cv Fuji, obtidos através do método Concert. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.	46
TABELA 5. Características físico-químicas de maçã cv. Fuji. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2006.	48
TABELA 6. Quantidade de RNA (ug/ul) ¹ de maçãs cv. Fuji obtidos por diferentes métodos de extração e de diferentes tecidos dos frutos. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	50
TABELA 7. Razão 260/280 do RNA de maçãs cv Fuji, obtidos através do método Concert. LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2006.	50
TABELA 8. Razão 260/280 de amostras de RNA, de maçãs cv Fuji, obtidos através do método Bugos. LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2006.	50
TABELA 9. Quantidade de RNA (ug/ul) ¹ de maçãs cv. Fuji nos diferentes tecidos dos frutos. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	55
TABELA 10. Quantidade de RNA (ug/ul) ¹ de maçãs cv. Fuji quando comparados os métodos Bugos e Concert. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	55
TABELA 11. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores baseados no trabalho de Sanches-Torres & Gonzalez-Candelas, (2003). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.	63
TABELA 12. Qualidade e quantidade de RNA total isolado de maçãs, cv Fuji. LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2005.	67
TABELA 13. Análise da similaridade de fragmentos seqüenciados isolados através da técnica de DD-RT-PCR na interação entre <i>B. dothidea</i> e frutos de maçã, através do programa Blast N. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.	70
TABELA 14. Análise da similaridade de fragmentos seqüenciados isolados através da técnica de DD-RT-PCR na interação entre <i>B. dothidea</i> e frutos de maçã, através do programa Blast X. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.	71

TABELA 15. Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores baseados no trabalho de Sanches-Torres & Gonzalez-Candelas, (2003). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	97
TABELA 16. Incidência de podridões em maçãs cv. Fuji, inoculados com os fungos <i>P. expansum</i> e ou <i>B. dothidea</i> , após 15 dias a 22,5°C, submetidas ao tratamento térmico por aspersão a 58°C, por 30 segundos. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/ UFRGS, Porto Alegre, 2006.	100
TABELA 17. Número médio de lesões por maçã da cv. Fuji, após 15 dias a 22,5°C, submetidas ao tratamento térmico por aspersão a 58°C por 30 segundos. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/ UFRGS, Porto Alegre, 2006.	103
TABELA 18. Diâmetro médio das lesões em maçãs da cv. Fuji, após 15 dias a 22,5°C, submetidas ao tratamento térmico por aspersão a 58°C por 30 segundos. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/UFRGS, Porto Alegre, 2006.	103
TABELA 19. Características físico-químicas de maçã cv. Fuji, inoculados e não inoculados com <i>B. dothidea</i> , submetidas ao tratamento térmico por aspersão a 58°C por 30 segundos, após 15 dias a 22,5°C, Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/ UFRGS, Porto Alegre, 2006.	105
TABELA 20. Características físico-químicas de frutos de maçã cv. Fuji inoculados e não inoculados com <i>P. expansum</i> submetidas ao tratamento térmico por aspersão a 58°C por 30 segundos, após 15 dias a 22,5°C, Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/ UFRGS. Porto Alegre, 2006.	105
TABELA 21. Características do RNA total de maçãs, cv. Fuji, obtidos através do Protocolo de Extração Concert™ Plant RNA Reagent Invitrogen®, LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	108

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1. Conídios de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (A). Conídios de <i>B.dothidea</i> em processo de germinação (B). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS.	8
FIGURA 2. Ascas com ascósporos de <i>Botryosphaeria dothidea</i> (A). Detalhes das ascas com ascósporos (B). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS.	9
FIGURA 3. Maçãs cv. Fuji com lesões ocasionadas por <i>Botryosphaeria dothidea</i> em maçãs 'Fuji'. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/UFRGS, Porto Alegre, RS.	10
FIGURA 4. Maçãs cv. Royal Gala (A) e Fuji (B) com sintomas de mofo azul. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/UFRGS, Porto Alegre, RS.	15
FIGURA 5. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Amostras de RNA extraídas segundo o método de RNA Concert™. Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.	43
FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Amostras de RNA extraídas pelo método Bugos. Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.	44
FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de epiderme de maçã cv. Gala (2 a 5), epiderme de maçãs cv. Fuji (6 a 9) e polpa de maçã cv. Gala (10 a 13) e cv. Fuji (13 a 17). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linhas 1 e 18, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2005.	45
FIGURA 8: Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs 'Fuji'. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Amostras de RNA extraídas segundo o método de micro-extração RNA Concert™. Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.	47
FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs 'Fuji'. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz	

ultravioleta. Amostras de RNA extraídas segundo o método de macro-extração Concert™. Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.	47
FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji no estágio de maturação senescente, método Bugos, epiderme, (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme +polpa (22 a 32). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linhas 1 e 18, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	50
FIGURA 11. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji no estágio de maturação senescente, método Concert, epiderme (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme + polpa (22 a 31). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	51
FIGURA 12. Eletroforese em gel de agarose da amplificação das amostras de RNA (Método Concert) de maçãs em estágio de maturação senescente, com oligonucleotídeos iniciadores de actina de Os fragmentos foram separados em gel de agarose (2,0%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	51
FIGURA 13. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji, estágio de maturação ideal, método Bugos, epiderme (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme+polpa (22 a 31). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	52
FIGURA 14. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji, estágio de maturação ideal, método Concert, epiderme (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme +polpa (22 a 31). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	52
FIGURA 15. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji, estágio de maturação verde, método Bugos, epiderme (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme +polpa (22 a 31). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	53
FIGURA 16. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji, estágio de maturação verde, método Concert, epiderme (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme +polpa (22 a 31). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	54
FIGURA 17. Eletroforese em gel de agarose da amplificação com oligonucleotídeo iniciadores de actina de amostras de RNA. Método	

Bugos (2 a 15) e Concert (16 a 31) de maçãs em estágio de maturação verde. Os fragmentos foram separados em gel de agarose (2,0%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.	54
FIGURA 18. Eletroforese em gel de agarose do RNA total maçãs cv. Fuji. (2 a 4), T1, (5 a 7) T2, (8 a 10) T3 (11 a 13) T4 e (14 a 16) T5. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linhas 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2005.	67
FIGURA 19. Perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação por PCR com primers de actina, separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Marcador 1 Kb. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.	67
FIGURA 20. Perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação DD-RT-PCR com diferentes combinações de oligonucleotídeos, separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Marcador 1 Kb, LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.	69
FIGURA 21. Produtos de re-amplificação por PCR de fragmentos diferencialmente expressos coletados do gel de poliacrilamida, separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Marcador 1Kb. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.	69
FIGURA 22. Produtos de re-amplificação por PCR de fragmentos diferencialmente expressos coletados do gel de poliacrilamida, separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Marcador 1Kb. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.	70
FIGURA 23. Os domínios das proteínas NBS-LRR. N: amino terminal, CC: domínio coiled-coil; NBS: nucleotídeo de ligação; L: ligante; LRR: domínio de repetições ricas em leucina, C terminal. (Adaptado de McHale, et al., 2006).	74
FIGURA 24. Detalhe do equipamento para aspersão da água, acoplado a máquina classificadora de frutos, Porto Alegre, 2006.	93
FIGURA 25. Detalhe da barra com os bicos de aspersão de água do tipo leque (Marca Jacto, mod. 110-SF-015), Porto Alegre, RS, 2006.	94
FIGURA 26. Perfil eletroforético do RNA total extraído de frutos de maçã cv. Fuji M - Marcador de 1Kb DNA. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2006.	108
FIGURA 27. Perfil eletroforético da amplificação do mRNA com oligonucleotídeos de actina. M- Marcador de 1Kb. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2006.	109
FIGURA 28. Produtos de re-amplificação por PCR, separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Marcador 1Kb, LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2006.	110

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A_{260} ou A_{280} – absorbância em comprimento de onda igual a 260 ou 280 nanômetro

ATP Adenosina-5'-trifosfato

ATT-Acidez Total Titulável

Blast – *Basic Local Alignment Search Tool*

cDNA DNA complementar

dATP 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato

dCTP 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato

DEPC Dietil pirocarbonato

dGTP 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato

DNA Ácido desoxirribonucléico

dNTP Desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTG, dGTP)

dTTP 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato

DTT Ditioneitol

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético

EST Expressed Sequence Tag

FP Firmeza de Polpa

g gravidade

mRNA RNA mensageiro

N Newtons

nt Nucleotídeo

pb Par de bases

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

PEG Polietilenoglicol

RNA Ácido ribonucléico

rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SST	Sólidos Solúveis Totais (%)
TBE	Tris-Borato-EDTA

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Cultura da Macieira

A maçã (*Malus domestica* Borkh) pertence à família Rosaceae e a subfamília Maloideae. As cultivares modernas são o produto da hibridização de *Malus sylvestris* e outras espécies de *Malus*, a maioria são diplóides ($2n=34$), auto incompatíveis e com um período de juvenilidade de 6 a 10 anos ou mais, (Arumuganathan & Earle, 1991). O fruto é um pomo, constituído pelo tubo floral que é composto pelas partes basais das sépalas e pétalas que fusionadas com o ovário inferior formam o fruto. O fruto fresco contém cinco cavidades, com duas sementes em cada uma, e é consumido no estágio maduro. A maçã é um fruto apreciado pelos consumidores devido a atributos como sabor, aroma e compostos que beneficiam a saúde, como elevado conteúdo de fibras, vitaminas e antioxidantes. No mercado internacional, maçã é o fruto de clima temperado de maior importância comercial (Zohary & Hopf, 2000).

O centro de origem da maçã é o Sul do Cáucaso, mas plantas de macieira também foram encontradas na Mesopotâmia, Irã e Oeste da Ásia. A cultura desta frutífera disseminou-se pela Europa através dos gregos e romanos. Como consequência da colonização, também foi disseminada para a

América do Norte, América do Sul, Austrália e África pelos ingleses, franceses e espanhóis.

A maçã é a fruta de clima temperado de maior importância comercial como fruta fresca, tanto no contexto internacional como nacional (Mello & Borges Junior, 2004). Atualmente, a Ásia possui a maior área cultivada com macieiras, seguida pela Europa, América do Norte, América do Sul, África e Austrália. A produtividade dos pomares varia muito. A América do Sul possui os melhores índices de produtividade por hectare (20-22 t/ha), seguida pela Europa (18 t/ha), África (13,8 t/ha), Ásia (11,5 t/ha) e Austrália (9,33 t/ha).

Segundo dados da FAO (2006), em 2005 a produção mundial de maçãs foi de 63,4 milhões de toneladas, em uma área colhida de 5,3 milhões de hectares. A China alcançou o primeiro lugar em volume produzido, com 34,72 % do total, seguida pelos Estados Unidos com 7,26 %, pela Polônia com 4,23 %, pela França com 4,06 % e pelo Irã com 3,98 %, os quais perfazem, no conjunto, 54,25 % da produção mundial. O Brasil ocupou o décimo quarto lugar na produção mundial com 870 mil toneladas.

O Brasil, nos últimos 30 anos, deixou de ser um grande importador desta fruta, para garantir o suprimento da maior parte do mercado interno e ganhar mercados externos, competindo com países de tradição pomícola como Nova Zelândia, África do Sul, Chile e Argentina. A área plantada na safra 2005/2006 ocupou 32.323 hectares, gerando entre empregos diretos e indiretos, aproximadamente 100 mil postos de trabalho (Vieira, 2006).

Alguns fatores contribuíram para o crescimento da atividade nos últimos anos, dentre os quais: a política de estímulo empreendida pelos diversos

agentes da cadeia produtiva da fruta (organização dos produtores, aumento de produtividade, qualidade, certificação e apresentação do produto, manutenção e conquistas de novos mercados); os fatores climáticos favoráveis (quantidade de frio suficiente e chuva no momento certo); o trabalho de polinização e a expansão da área cultivada com macieiras (em idade produtiva).

A expansão das vendas da fruta nacional para o mercado internacional começou em 1999 e continuou crescendo nos anos seguintes, atingindo no ano de 2004 a cifra recorde de 153 mil toneladas. São mais de 30 países (principalmente do continente Europeu) que dão preferência ao nosso produto, devido à sua qualidade, tamanho e sabor característico. As maiores áreas plantadas concentram-se nos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. As principais cultivares são Gala e Fuji incluindo seus clones, ocupando 90% da área plantada (ABPM, 2006).

A cultivar Fuji caracteriza-se por frutas de cor avermelhada opaca com estrias difusas, de tamanho grande, polpa firme e muito suculenta. É uma cultivar de ciclo tardio com colheita realizada no final de março e início de abril. Apresenta excelente potencial de conservação, entre 8 a 10 meses em atmosfera controlada (Camilo & Denardi, 2002). Seu metabolismo celular é caracterizado pela baixa produção de etileno e respiração. Durante o armazenamento em atmosfera controlada é suscetível à degenerescência de polpa, dano ocasionado pelas altas concentrações de CO₂. Além disso, por se tratar de uma cultivar tardia, com característica de acúmulo de elevados teores de açúcares, é sensível à ocorrência de “pingo de mel”, distúrbio que favorece

o desenvolvimento de degenerescência de polpa durante o armazenamento (Camilo & Denardi, 2002).

A satisfação do consumidor, principal objetivo da produção, colheita, armazenamento e distribuição de maçãs estão diretamente relacionados com a qualidade dos frutos. A definição de maçã de qualidade varia nas diferentes etapas da cadeia produtiva e também depende das perspectivas dos consumidores. O termo qualidade reflete o grau de excelência do produto, compreendendo propriedades sensoriais (aparência, textura, sabor e aroma), valor nutricional, constituição química, propriedades mecânicas, características funcionais e defeitos (Abbott, 1999). Dentro destes parâmetros, uma maçã aceitável para o consumo deve ser livre de danos mecânicos, desordens fisiológicas e doenças, além de apresentar características típicas de firmeza de polpa, suculência, crocância, e sabor característico, uma mistura complexa de açúcares, ácidos e substâncias voláteis (Perring, 1989 e Baldwin, 2002). Todavia, a influência de características não visuais como sabor, textura, valor nutricional e ausência de resíduos de pesticidas em maçã têm aumentado atualmente (Awad & De Jager, 2003).

A redução da qualidade dos frutos de maçã, que causa diminuição do valor nutricional, ocorre no intervalo entre a colheita e o consumo. As perdas de qualidade variam entre 5 e 25% nos países desenvolvidos e entre 20 e 50% nos países subdesenvolvidos (Kader, 2005). Uma meta essencial das pesquisas em fisiologia pós-colheita é a redução dessas perdas. Isso não pode ser realizado sem o bom entendimento das causas biológicas, ambientais e de manejo que ocasionam essas perdas e sem a utilização de tecnologias que

reduzem os processos de maturação e mantêm a qualidade em níveis aceitáveis (Hofman, 1998). As perdas em pós-colheita podem ser categorizadas com base na causa em três classes: danos mecânicos, desordens fisiológicas e danos biológicos, tais como, ataque de insetos e doenças (Ferguson et al., 2000).

1.2. Doenças em Pós-colheita de Maçãs

As doenças pós-colheita são o resultado de dois tipos de infecções: a) aquelas resultantes de danos ocorridos durante a colheita e manuseio, ou b) infecções latentes ou quiescentes iniciadas durante o período de crescimento dos frutos (Bruton, 1994). Em maçãs, podem ocorrer estes dois tipos de infecção. Dentre os microrganismos causadores de doenças, os fungos são a principal causa de perdas em maçãs armazenadas (Spadaro et al., 2004). Mais de 150 espécies de fungos foram observadas durante o armazenamento de maçãs, em diferentes regiões produtoras do mundo (Sass, 1993). As doenças de mais difícil controle são o mofo azul (*Penicillium* spp.), a podridão branca (*Botryosphaeria dothidea*), a podridão amarga (*Glomerella cingulata*) e o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*).

A ocorrência e manutenção da latência do patógeno no hospedeiro é o resultado do equilíbrio entre hospedeiro, patógeno e ambiente, onde não há sintoma visual da doença. As respostas bioquímicas e fisiológicas pós-colheita do hospedeiro podem desencadear mudanças neste equilíbrio e, conseqüentemente, ativar o patógeno. Ao mesmo tempo, o patógeno que se mantém com um baixo nível metabólico durante a latência, pode ativar fatores

de virulência, resultando em parasitismo ativo nos tecidos do hospedeiro (Jarvis, 1994).

O amadurecimento do fruto envolve várias mudanças físico-químicas antes e após a colheita, as quais determinam a qualidade do fruto para o consumo (Wills et al., 1981). Os sinais visíveis de amadurecimento são mudanças na cor, na firmeza, na suculência, no sabor e no aroma que levam ao estado ótimo para o consumo, sendo estes determinados pelas mudanças na estrutura e metabolismo dos tecidos do fruto (Biale, 1975; Rhodes, 1980). As operações realizadas em pós-colheita dos frutos têm como função fornecer um ambiente que minimize a deterioração do produto até chegar ao consumidor, além de estender o período de oferta. Em geral, frutos colhidos exibem considerável resistência aos patógenos, porém, com o início do amadurecimento e senescência ocorre um aumento da predisposição à infecção (Sommer, 1985).

As doenças de frutos em pós-colheita apresentam diferentes tipos de sintomas resultantes das alterações na estrutura e nos processos bioquímicos dos frutos. Em nível celular, podem ocorrer, entre outras, a plasmólise e a vacuolose. Alterações na fisiologia dos frutos podem ser verificadas através do aumento da atividade respiratória, da transpiração e da produção de etileno. Em relação aos sintomas morfológicos podem ocorrer necroses caracterizadas pela degeneração do protoplasto, seguido de morte celular (Pascholatti & Leite, 1995).

Na cultivar Fuji, a incidência do mofo azul e da podridão branca tem aumentado nos últimos anos, devido principalmente ao prolongamento no

período de armazenagem desta cultivar e por conseqüência do surgimento de raças do patógeno de *Penicillium expansum* resistentes aos fungicidas utilizados. No caso de *B. dothidea*, o aumento da doença a campo, nos últimos anos deve-se principalmente a proibição dos benzimidazóis (Berton, 2007) (comunicação pessoal).

1.2.1. Podridão Branca

1.2.1.1. Etiologia

O fungo *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De Not.) é bastante disseminado e infecta muitas espécies vegetais principalmente plantas frutíferas como as rosáceas, caquizeiro, castanheira, videira, citros, entre outras (Boneti & Katsurayama, 1999). No Brasil, o fungo foi descrito em macieira primeiramente por Melzer & Berton (1986), a partir do levantamento de plantas atacadas com cancrios, provenientes de diferentes pomares do Estado de Santa Catarina. Os sintomas observados foram a morte de ramos, cancrios no caule e morte das plantas de três a cinco anos. Este mesmo trabalho também relata a ocorrência de podridão causada por este patógeno em frutos de maçã das cultivares Golden Delicious e Fuji.

O nome *Botryosphaeria* é aplicado aos ascomicetos com ascas bitunicadas, produzidas em ascomas estromáticos pseudoteciais. A taxonomia do gênero e a diferenciação de espécies são baseadas na morfologia do estágio assexual. O modo como esporos assexuais são gerados e liberados a partir das suas células mãe variam bastante (Denman et al., 2000).

Os ascosporos são hialinos e aceptados, medindo de 18 a 25,5 µm por 7,5 a 12µm. Os conídios medem 21-28 por 4-4,5µm, são hialinos, não

septados, com parede estreita ou, mais raramente, escuros e com um septo. No hospedeiro, o ascomata inicialmente imerso, separado ou agrupado em estromas complexos multiloculares. Estes rompem a epiderme abrindo-se através de um ostíolo com lóculos individuais com tamanho de 180 a 250 μm de diâmetro (Denman et al., 2000).

As culturas inicialmente são brancas, com abundante crescimento micelial aéreo, adquirindo gradualmente uma coloração verde-escura. A superfície abaxial da colônia vista da placa é inicialmente branca, mas, após 2-3 dias torna-se verde-escura ou verde-oliva a partir do centro. Essa coloração se espalha gradativamente conforme a colônia vai envelhecendo. Conidiomatas multiloculares e estromáticos se abrem através de vários poros, sendo que a formação de esporos ocorre em oito dias a 25°C em meio contendo aveia. A produção de conídios para inoculações artificiais pode ser obtida em discos de papel filtro sobre o meio de cultura agar, batata, dextrose (BDA), quando o fungo é crescido por 15 dias a 26°C sob luz fluorescente constante (Phillips et al., 2005).

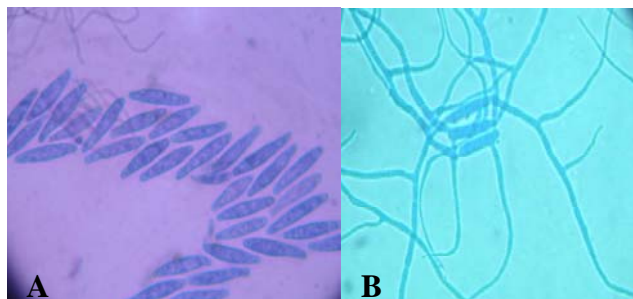


FIGURA 1. Conídios de *Botryosphaeria dothidea* (A). Conídios de *B.dothidea* em processo de germinação (B). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS.

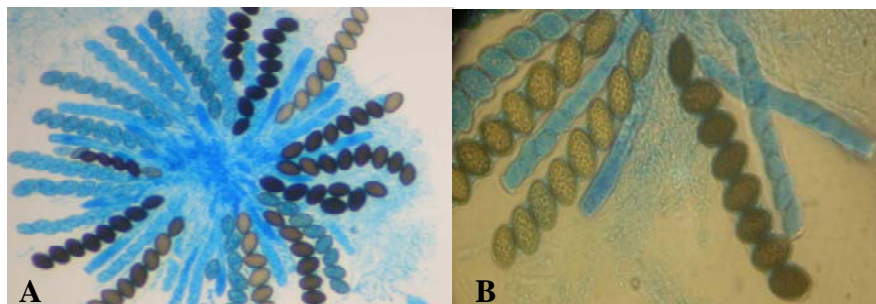


FIGURA 2. Ascas com ascósporos de *Botryosphaeria dothidea* (A). Detalhes das ascas com ascósporos (B). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS.

1.2.1.2. Sintomatologia

A podridão branca é uma doença de ocorrência comum nas regiões produtoras de maçã de clima quente e úmido. Em anos quentes e chuvosos a ocorrência de podridão nos frutos aumenta. Nos frutos, as lesões tornam-se visíveis entre seis e oito semanas antes da colheita, muito embora a infecção possa ocorrer desde o início do ciclo vegetativo (Parker & Sutton, 1993).

O fungo *B. dothidea* pode causar dois tipos de podridões em maçãs, resultando em dois tipos de sintomas, dependendo do estágio de desenvolvimento em que os frutos são infectados. Uma podridão origina-se de infecções externas e outra parece estar relacionada a infecção interna do fruto. A podridão externa é visível primeiramente como uma pequena mancha marrom, levemente profunda, que pode ser circundada por um halo avermelhado. As áreas da podridão vão expandindo e, eventualmente, podem tomar conta de todo o fruto. Variedades de epiderme vermelha podem branquear durante o processo de apodrecimento, tornando-se marrom-claras.

Devido a esta característica a podridão é referida como 'podridão branca'. A podridão externa pode ser confundida com a podridão preta e também com a podridão amarga. Maçãs com podridão externa de *Botryosphaeria* podem apresentar os sintomas rapidamente após a colheita ou após a saída do armazenamento a frio.

A podridão de origem interna apresenta lesões moles e gotículas de líquido que podem se formar na superfície do fruto. Corpos de frutificação do fungo podem ser vistos sob a epiderme em maçãs sob temperatura ambiente (Phillips et al., 2005).



FIGURA 3. Maçãs cv. Fuji com lesões ocasionadas por *Botryosphaeria dothidea* em maçãs 'Fuji'. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/UFRGS, Porto Alegre, RS.

1.2.1.3. Ciclo da Doença

O fungo *B. dothidea* sobrevive de um ano para outro na planta infectada, sob a forma de micélio, picnídios e pseudotécios presentes nos cancrios que se formam nos ramos mortos e mumificados. Os ascósporos e os conídios são produzidos nos ramos eliminados durante a poda e deixados próximos aos pomares, durante todo o ciclo vegetativo da cultura. O fungo pode infectar várias espécies florestais, mas não existem informações sobre a ocorrência e a importância destes hospedeiros no Brasil. A principal fonte de inóculo de *B.*

dothidea são os conídios, encontrados nos pomares de maçãs nos ramos e folhas que permanecem de uma safra para outra (Sutton & Arauz, 1991).

Durante a primavera e em verões chuvosos, ocorre principalmente a liberação de conídios, dentro da mesma planta. Ramos com ferimentos são especialmente suscetíveis à invasão deste fungo, mas brotações novas e ramos sadios também podem ser infectados, resultando na doença conhecida como cancro de papel.

No Brasil, a fase sexual do fungo foi encontrada em pereiras com sintomas de seca de ramos, por Becker & Ieki (2002). Os ascósporos são transportados pelo ar e fonte de inóculo entre plantas. O número de ascósporos (e conídios) liberados durante a chuva está correlacionado diretamente com a duração e quantidade da chuva. A temperatura ótima para a germinação dos conídios em água varia de acordo com o isolado, ficando entre 26,7°C e 29,5°C (Sutton & Arauz, 1991). A germinação é significativamente maior na presença de água livre, mas pode ocorrer em condições de umidade relativa acima de 96%. A viabilidade dos conídios diminui rapidamente nos primeiros vinte minutos, quando expostos para secagem ao ar. Os ascósporos germinam em uma ampla faixa de temperatura sendo a temperatura ótima de 26,4°C e umidade relativa entre 92 e 100% (Berton et al., 2002).

A infecção nos frutos pode ocorrer em qualquer período desde o início do desenvolvimento destes até o momento da colheita (Parker & Sutton, 1993). A infecção latente não é evidente nos frutos verdes e os sintomas começam a desenvolver-se com o avanço da maturação, manifestando-se entre 6 a 8 semanas antes da colheita dos frutos. Este processo está relacionado a vários

fatores do hospedeiro, como a presença de compostos fenólicos, sólidos solúveis totais, pH e acidez dos frutos (Kohn & Hendrix, 1983). Estes são geralmente aceitos como compostos fungistáticos em frutos imaturos, podendo incluir-se também as fitoalexinas e o ácido benzóico e outros substratos do fruto desfavoráveis ao crescimento e desenvolvimento do fungo, sendo estes então responsáveis pela supressão da invasão dos tecidos pelo fungo e aparecimento dos sintomas nos frutos imaturos (Brown, 1984; Kohn & Hendrix, 1983).

De acordo com Brown & Hendrix (1981) e Melzer & Berton, (1986), a doença se desenvolve mais rapidamente em locais feridos por cortes de poda, por taquaras ou arames para arqueamento, por máquinas agrícolas, por granizo, por queimaduras pelo sol ou que foram atacados por insetos. Deste modo, safras cujo ataque de insetos é intenso, ficam sujeitas ao aumento na incidência de podridão branca, uma vez que os danos ocasionados por estes podem favorecer a penetração de fungos.

Estudos desenvolvidos por Guang-xu et al, (2006) demonstraram que a germinação de conídios e a formação do apressório se completam em dois dias. O micélio cresce lentamente na superfície das lenticelas e 10 dias após a inoculação ocorre o aparecimento dos sintomas. De 20 a 30 dias após a inoculação, o micélio se expande e ramifica. Neste estágio, a penetração das hifas do patógeno ocorre superficialmente nas lenticelas. Entre 40 a 50 dias após a inoculação, o micélio desenvolve-se mais vigorosamente e algumas hifas introduzem-se na segunda camada da lenticela. O número, tamanho e

rachaduras das lenticelas aumentam com o desenvolvimento dos frutos, facilitando assim a penetração do fungo.

1.2.2. Mofo Azul

1.2.2.1. Etiologia

A podridão conhecida por mofo azul ou bolor azul é causada por várias espécies de *Penicillium* e, provavelmente mais em função da dificuldade de diferenciar as diversas espécies deste fungo que atacam maçãs, o mofo azul geralmente seja atribuído a *P. expansum*, a espécie mais agressiva e mais comumente encontrada (Jones & Aldwinckle, 1990). A habilidade das diferentes espécies em colonizar os tecidos de maçã não está suficientemente estudada (Amiri & Bompeix, 2005). No Brasil, não há estudos diferenciando as espécies de *Penicillium* que causam o mofo azul, mas no Uruguai, além do *P. expansum* foi encontrado também *P. solitum* (Pianzola et al., 2004). Já na França, Amiri & Bompeix (2005) encontraram *P. commune*, *P. verrucosum*, *P. chrysogenum* e *P. rugulosum*, em frutos com mofo azul, mas a incidência de *P. expansum* sempre foi prevalente, ocorrendo em 30 a 62% das amostras analisadas.

A característica mais importante que diferencia *P. expansum* das demais espécies de *Penicillium* são os conídios verde opacos. Frequentemente, ocorre a presença de um exudato laranja ou marrom no lado reverso da colônia (Pitt & Hocking, 1997).

O fungo *P. expansum* é um microorganismo psicrófilo, podendo desenvolver-se a partir de temperaturas de -6°C, com temperatura ótima de 25°C (Pitt & Hocking, 1997). O fungo geralmente infecta os frutos acometidos

por danos mecânicos, devido à manipulação inadequada, danos por insetos e, ocasionalmente, através das lenticelas, principalmente quando os frutos passaram por estresse hídrico no período próximo a colheita ou estão em processo avançado de senescência. Os esporos de *P. expansum* podem sobreviver de uma safra para outra em sacolas de colheita, bins e nas câmaras de armazenamento. A contaminação dos frutos pode ocorrer no pomar, máquinas de seleção e embalagem, câmaras de armazenamento (Amiri & Bompeix, 2005).

1.2.2.2. Sintomatologia

O mofo azul, causado por *P. expansum*, é uma das principais doenças em pós-colheita de maçãs (Snowdon, 1990; Jones & Aldwinckle, 1990; Pratella, 1996). Esta podridão é responsável por 80 a 90% das perdas ocasionadas por podridões (Vinas et al., 1998). No Brasil, este fungo é considerado o principal agente causador de podridões durante o armazenamento de maçãs e, se encontra difundido em todas as regiões produtoras (Bleicher & Bernardi, 1985), causando perdas de até 30% nas frutas armazenadas (Sanhueza, 1991).

A podridão é caracterizada pelo aparecimento de áreas moles e aquosas. A superfície das podridões mais antigas pode estar coberta por esporos de coloração verde-claros, inicialmente brancos (Figura 4). *P. expansum* é um patógeno necrotrófico, ou seja, não produz estruturas de penetração especializadas, mas segrega enzimas. Em decorrência disto as podridões são de consistência mole e aquosa, sendo estas as principais características das podridões causadas por este patógeno. Conídios de *P.*

expansum penetram através de ferimentos e micro-ferimentos, ocasionados pela colheita e manuseio dos frutos (Spotts & Cervantes, 1996). A infecção também pode ocorrer através da região do pedúnculo, do cálice aberto ou de lenticelas (Amiri & Bompeix, 2005). A água utilizada nas operações de packing-house pode remover e concentrar os propágulos do fungo presentes na superfície dos frutos, solo e restos de folhas (Spott & Cervantes, 1986; Sanderson & Spotts, 1995). Os conídios presentes nas soluções de lavagem podem aumentar a fonte de inóculo e a incidência das podridões. O mofo azul pode ocorrer mesmo em temperaturas de armazenagem de 0°C, mas a podridão desenvolve-se lentamente nestas condições. Períodos prolongados de armazenagem em frio seguido de transferência dos frutos para a temperatura ambiente favorecem o desenvolvimento da podridão (Snowdon, 1990; Pratella, 1997).



FIGURA 4. Maçãs cv. Royal Gala (A) e Fuji (B) com sintomas de mofo azul. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/UFRGS, Porto Alegre, RS.

1.3. Controle de Doenças em Pós-Colheita

Fungicidas sintéticos como iprodione e tiabendazole são utilizados para o controle de doenças em pós-colheita de maçãs. Preocupações a respeito da quantidade de resíduos destes e o aumento da resistência de fungos levaram a restrição e suspensão de sua utilização em pós-colheita. Além da utilização de

fungicidas, algumas técnicas são recomendadas para diminuir a incidência de podridões em pós-colheita, como por exemplo, o pré-resfriamento dos frutos logo após a colheita. O armazenamento em baixas temperaturas ou em condições de atmosfera controlada (AC) também diminuem a incidência de podridões. O efeito positivo destas técnicas deve-se ao retardamento do metabolismo do fruto e, conseqüentemente, do amadurecimento, senescência, e da inibição do crescimento de fungos (Agar et al., 1990). Todavia, sob estas condições, ainda ocorrem perdas elevadas por podridões fúngicas, gerando a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de controle destes patógenos.

Alternativas aos fungicidas visando o controle de doenças em pós-colheita têm levado ao estudo de indutores de resistência nos frutos contra a infecção por patógenos. A indução de resistência tem sido considerada uma ferramenta promissora para o controle de doenças em pós-colheita Terry & Joyce, (2004); Liu et al. (2005). Esta indução de resistência pode ser desencadeada por elicitores, biológicos, físicos e químicos.

1.3.1. Tratamento térmico

O tratamento térmico é uma alternativa de controle de doenças em pós-colheita, pois interfere no desenvolvimento do patógeno bem como pode atuar como um elicitor físico na indução da resistência. Existem diferentes formas de aplicação do tratamento térmico nos frutos, podendo ser através da imersão ou aspersão de água quente, vapor ou ar aquecido (Lurie, 1998).

A utilização do tratamento térmico com água quente, como forma de controlar patógenos tem sido testada em frutas de diversas espécies, tais

como: citros (Couey, 1989; Zhang & Swingle, 2005; Erkan et al., 2005.), maçã (Burchill, 1964; Sams et al., 1993; Roy et al., 1994; Lurie, 1998; Fallik et al., 2001; Lunardi et al., 2002, 2003; Oster, 2004, 2006; Tahir, 2006), pêssego (Phillips & Austin, 1982; Karabulut, 2002), nectarina (Anthony et al., 1989) e pêra (Schirra et al., 1999).

O tratamento térmico tem sido utilizado, geralmente, para o controle de fungos patogênicos, desde que os esporos e infecções latentes encontrem-se na superfície ou nas primeiras camadas celulares no interior da epiderme do fruto. Os tratamentos térmicos com o uso do calor podem controlar patógenos pela desnaturação de proteínas, liberação de lipídios, destruição de hormônios, redução de reservas ou injúrias metabólicas (Barkai-Golan & Phillips, 1991). Os tratamentos com calor podem afetar diretamente o patógeno, através da inibição ou retardamento da elongação do tubo germinativo, ou ainda, inativando os esporos (Ferguson et al., 2000). A eficácia do tratamento térmico sobre patógenos fúngicos é medida pela redução da viabilidade do microorganismo na germinação do esporo ou crescimento micelial.

Por outro lado, a qualidade dos frutos pode ser afetada através da perda de água, alteração na cor da epiderme, no metabolismo dos açúcares, produção de etileno, danos na epiderme, podendo ainda aumentar a sensibilidade à contaminação por patógenos (Barkai-Golan & Phillips, 1991). Ainda, segundo Kays (1991), as altas temperaturas podem causar efeitos indiretos tais como inibição da síntese de pigmentos, formação de superfícies escurecidas, lesões e colapsos de proteínas.

Os tratamentos de calor são um estresse para o tecido e, como tal, os tecidos da planta respondem tentando reparar os danos causados. Pode ocorrer também a inibição do amadurecimento e atraso do colapso e extinção de substâncias antifúngicas pré-formadas que estão presentes nos frutos imaturos. Alguns autores (Schirra et al., 2000; Pavoncello et al., 2001) afirmam que o tratamento térmico pode induzir a síntese de fitoalexinas, como o escoparone e a escopoletina, além de proteínas relacionadas à patogênese.

A combinação do tratamento térmico através de aspersão com água aquecida e escovação dos frutos, permite que sejam realizadas simultaneamente a limpeza e desinfecção dos frutos. Esta tecnologia já é utilizada comercialmente em linhas de processamento e seleção de pimentas e melões em Israel (Fallik, 1999, 2000, 2004) e mangas, (Prusky et al., 1999). Experimentos de pós-colheita conduzidos com diferentes espécies de citros como tangerinas, mandarinas, laranjas e pomelos produzidos em sistema orgânico demonstraram que o tratamento térmico aliado à escovação em máquina classificadora reduziu a incidência de podridões entre 45-55% (Porat et al., 2000). O tratamento de maçãs através deste sistema (55°C por 15 segundos) resultou na diminuição do número de podridões causadas por *P. expansum* e inibiu o processo de maturação dos frutos (Fallik et al., 2001).

A utilização de tratamento com água aquecida a 50°C durante 60 a 90 segundos, tem demonstrado efeito positivo no controle da podridão branca, causada por *B. dothidea*, em maçãs 'Fuji'. Os frutos tratados apresentaram menor percentagem de podridões e menor diâmetro de lesões. A utilização de temperaturas que variam de 45 a 55°C, por até 90 segundos, não danificou a

epiderme de maçãs 'Fuji' (Bender & Oster, 2001). Maçãs submetidas ao tratamento térmico mantiveram a firmeza da polpa e apresentaram maior resistência a escaldadura superficial do que maçãs não tratadas com calor (Klein & Lurie, 1992). A inibição da síntese de enzimas hidrolíticas da parede celular como poligalacturonases e galactosidades durante o tratamento térmico poderiam explicar a manutenção da firmeza de polpa mais elevada do que em frutos não submetidos ao calor (Sozzi et al., 1996).

Em comparação com frutos não tratados por calor, a aplicação do tratamento térmico em maçãs cv. Aroma a 30°C por 24 horas reduziu as podridões causadas por *Pezizula malicorticis* e *Colletotrichum gloeosporioides* em níveis de 43, 25 e 34%, em três safras consecutivas. Em duas das três safras estudadas, o tratamento térmico também reduziu a incidência de mofo azul (*P. expansum*) em 31 e 25%. Tratamentos similares na cv. Cox's Orange Pippin demonstraram uma redução de 20% nas podridões causadas por *P. expansum* (Tahir, 2006). Diversos trabalhos sugerem que o tratamento térmico não inativa completamente os esporos ou o micélio em crescimento (Dettori et al., 1996; Lurie et al., 1998; Schirra et al., 2000). Todavia o interesse na utilização do tratamento térmico reside no fato do aumento da resistência dos tecidos aos patógenos. Segundo Barkai-Golan & Phillips, (1991), Roebroek et al. (1991) e Spadaro et al. (2004) o estresse por calor pode afetar o núcleo, as paredes celulares e também as mitocôndrias ou desnaturar proteínas. Os sistemas de resposta de defesa em frutos são constituídos por ambos, fatores constitutivos e não-constitutivos, os quais podem ser afetados pela aplicação do tratamento térmico (Ben Yehoshua et al., 1998).

O tratamento térmico tem sido utilizado no controle de algumas doenças e também para manter a qualidade durante o armazenamento (Ferguson et al., 2000; Paull & Chen, 2000). Segundo Tahir (2006), em maçãs cv. Aroma, a produção de etileno aumentou seis dias após o armazenamento nos frutos não tratados com calor, permanecendo constante nos frutos submetidos ao calor. Trabalhos anteriores demonstraram que o tratamento térmico diminuiu os níveis de respiração (Janisiewicz et al., 2003), a produção de etileno (Saftner et al., 2003), ou ambos (Conway et al., 1994), além de inibir a síntese de enzimas hidrolíticas da parede celular (Lurie, 1998), resultando em um atraso nos processos de maturação e maior resistência às podridões durante o armazenamento.

Os mecanismos de defesa dos frutos contra patógenos envolvem um complexo de interações com diferentes respostas, como, barreiras mecânicas, compostos químicos antimicrobianos, e proteínas relacionadas com a patogênese (PR). O tratamento térmico de tomates verdes, fisiologicamente desenvolvidos, evidenciou o atraso na degradação do mRNA codificante de peroxidases e manteve a resistência antifúngica nos tecidos do fruto durante o período de tratamento de 3 dias a 38°C, os quais desapareceram após a suspensão do tratamento térmico (Lurie et al., 1997).

A resistência bioquímica dos frutos pode ser o resultado da presença de moléculas pré-formadas ou induzidas, tais como as fitoalexinas, quando estimulado por elicitores bióticos ou abióticos. Tanto nos casos de doenças pós-colheita com infecções facilitadas por danos físicos como nas doenças latentes, compostos antimicrobianos naturais, produzidos pelo hospedeiro, tem

papel importante no mecanismo de defesa contra o desenvolvimento de podridões. Por outro lado, enquanto o fruto amadurece, a concentração destes compostos tende a diminuir para concentrações ineficazes ao processo de defesa (Kim et al., 1999).

Segundo Pavoncello et al. (2001), dois grupos de proteínas podem ser ativadas pelo tratamento térmico com água, as quais participam do processo de resistência induzida no fruto: proteínas de choque de calor (HSPs) e PRs. As HSPs compreendem um grupo diversificado de proteínas com massa entre 15 e 115 kDa, as quais são expressadas em todos os organismos em resposta a elevadas temperaturas. A expressão de genes HSP e a síntese de proteínas estão associadas com o aumento da exposição ao calor de várias partes das plantas, inclusive os frutos (Ferguson et al., 2000). Não há evidências que as HSPs possam ter propriedades antimicrobianas, porém, o tratamento com calor, o qual pode inibir o amadurecimento, poderia atrasar a quebra ou o desaparecimento de compostos antimicrobianos pré-formados que estão presentes em frutos imaturos (Prusky, 1996).

Estudos da expressão gênica em resposta ao calor têm revelado diversos genes induzidos pelo tratamento térmico relacionados com a proteção dos tecidos dos frutos aos danos de frio. Segundo Porat et al. (2002, 2004) o tratamento térmico em pomelos, induziu a expressão de genes que levaram ao aumento da tolerância ao estresse por frio em laranjas e pomelos.

As proteínas PR, codificadas por genes do hospedeiro são induzidas pela infecção do patógeno e apresentam um papel na defesa contra uma ampla variedade de patógenos. As proteínas PRs melhor caracterizadas são

as enzimas com atividade β - 1,3 – glucanásica e quitinásica. Ambas hidrolisam polímeros da parede celular do fungo e, portanto, podem estar envolvidas no mecanismo de defesa da planta contra a infecção do fungo (Lurie, 1998). Porat et al. (2000) reportam que o tratamento com calor induziu a biogênese de PRs como a quitinase e a β - 1,3 glucanase em pomelos 'Star Ruby' e que conferiu maior resistência contra o patógeno *P. digitatum*.

1.4. Análise da expressão diferencial de genes

As macieiras cultivadas são diplóides, ($2n=34$), auto-incompátveis e com período de juvenilidade de 6 a 10 anos. O genoma é relativamente pequeno, estimado em 743 a 796 Mb por genoma haplóide, similar ao genoma do sorgo e com mesmo tamanho do genoma do tomate (Arumuganathan & Earle, 1991).

A maçã tem sido utilizada como modelo dentre as frutíferas para o estudo de características como: hábito de florescimento e frutificação, enxertia, biossíntese de compostos aromáticos e resistência a doenças e pragas. Inúmeros trabalhos utilizando as técnicas de expressão diferencial de genes tem sido desenvolvidos e a velocidade de descoberta dos genes relacionados a estas características, o desenvolvimento de marcadores moleculares e o melhoramento de cultivares tem gerado uma grande quantidade de ESTs de vários tecidos de maçã, principalmente de tecidos do fruto, tornando essa frutífera o modelo ideal para estudos moleculares na família Rosaceae (Newcomb et al., 2006).

Mundialmente, vários grupos trabalham na identificação e caracterização de genes em larga escala envolvidos em inúmeras características importantes em maçã, visando entender a regulação dos processos de florescimento, frutificação, maturação e respostas à patógenos. Dentre estes grupos pode ser citado o 'Apple ESTs Project' desenvolvido em conjunto por universidades americanas (<http://titan.biotec.uiuc.edu/apple/apple.shtml>). Outro grupo pertencente ao Horticultural and Food Research Institute da Nova Zelândia publicou recentemente um trabalho no qual segundo Newcomb et al. (2006) mais de 150.000 ESTs foram identificados a partir de 43 bibliotecas de cDNAs de maçãs, representando 34 tecidos e tratamentos. A comparação destas seqüências com bancos de dados disponíveis, revelou a presença de inúmeros genes relacionados com a resistência a doenças, e a biossíntese de compostos associados ao sabor e ao aroma dos frutos.

Park et al. (2006) analisaram mais de 70 bibliotecas de cDNAs de macieira disponíveis nos bancos de dados públicos, através de programas estatísticos. Estas 70 bibliotecas representavam diversos transcritos, de diferentes órgãos, estádios de desenvolvimento e submetidos a diferentes tipos de estresse, biótico e abiótico de nove cultivares de macieira. Este grupo utilizou os dados destas bibliotecas na tentativa de categorizar os genes envolvidos em diferentes rotas metabólicas de importância para as características de sabor e aroma em maçãs.

Lee et al. (2007) utilizaram a técnica de microarray para avaliar a expressão gênica nos primeiros estádios de desenvolvimento dos frutos de maçã. Neste estudo foram isolados 6.253 cDNAs de frutos verdes e maduros

da cultivar Fuji. Dentre estes cDNAs 192 apresentaram expressão em frutos verdes, quando comparados com outros tecidos. A confirmação destes dados através de RT-PCR revelou que grande parte dos transcritos diferencialmente expressos em frutos verdes também são expressos em outros órgãos da planta, porém não são expressos nos frutos maduros.

Além dos trabalhos em larga escala, inúmeros outros grupos também trabalham na tentativa de entender melhor a expressão gênica em maçãs, estudando as respostas ao ataque de patógenos (González-Candellas et al., 2003; Degenhardt et al., 2005; Kuerkcueoglu et al., 2007), ataque de pragas (Reineke & Zebitzet, 2005), características do fruto (Yao et al., 2007) e mudanças que ocorrem durante o processo de maturação (Goulao & Oliveira, 2007; Lee et al., 2007).

Uma série de metodologias podem ser usadas para a identificação e isolamento de genes expressos diferencialmente em plantas frutíferas. Entre as metodologias que mais se destacam hoje estão a hibridização subtrativa supressiva (Gray et al., 2000; Davies & Robinson, 2000; Itai et al., 2000; Nam et al., 1999), o cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphisms) (Jones et al., 2000; Venter et al., 2001), o DD-RT-PCR ('differential display reverse transcriptase-PCR') (Oh et al., 1995; Wilkinson et al., 1995; Manning, 1998; Zegzouti et al., 1999), e os micro arranjos de DNA (Freeman et al., 2000).

A escolha do método depende de diversos fatores, como a quantidade de informações disponíveis sobre a espécie estudada, a quantidade de seqüências disponíveis, a abundância de transcritos que se procura, além do custo das análises e da estrutura do laboratório. A técnica de DD-RT-PCR,

apesar de gerar menor volume de informações que o microarray, é relativamente de baixo custo e de fácil implementação. A técnica foi apresentada pela primeira vez em 1992 (Liang & Pardee, 1992), e tem assumido uma grande importância no descobrimento de novos genes envolvidos em vários processos metabólicos tanto em plantas quanto em animais (Wilkinson et al., 1995; Wilkins et al., 1998). Este método pode ser utilizado no estudo das interações patógeno-hospedeiro, resultando na identificação de genes regulados durante a infecção com fungos (Benito et al., 1996) e bactérias (Sheehaus & Tenhaken, 1998). Através do DD-RT-PCR, foi possível determinar uma grande parte de transcritos presentes em células de eucarióticos, a partir de um único experimento e com alta sensibilidade (Kuhn, 2001). DD-RT-PCR tem sido empregado para isolar um grande número de genes de plantas que são diferencialmente expressos em resposta a estresses ambientais (Masmoudi et al., 2001) e durante etapas específicas do desenvolvimento (Walden et al., 1997).

A transcrição reversa associada à reação de PCR, RT-PCR literalmente revolucionou o estudo da expressão gênica. Através desta técnica é possível detectar os transcritos de qualquer gene, independente da quantidade de material inicial. Na reação de RT-PCR, RNA molde é copiado em um transcrito de DNA complementar (cDNA) através da enzima transcriptase reversa. A seqüência de cDNA de interesse é então amplificada exponencialmente usando PCR. A detecção dos produtos de PCR é realizada através do gel de poliacrilamida (Shoham et al., 1999).

A técnica de DD-RT-PCR inclui, em ordem de aplicação, a obtenção de RNA livre de DNA, produção de cDNA pela transcrição reversa do mRNA (RT), amplificação do cDNA por PCR, e a separação e seleção visual de cDNAs amplificados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Os fragmentos de cDNAs são recuperados do gel, reamplificados por PCR, clonados e seqüenciados (Shoham et al., 1999).

A técnica apresenta as seguintes vantagens: O DD-RT-PCR é técnica mais sensível para a detecção de mRNAs. Teoricamente uma única cópia da mensagem pode ser detectada através desta técnica. Na prática, milhares de cópias são necessárias para uma possível quantificação. Devido a sensibilidade da técnica de DD-RT-PCR requer amostras livres de DNA genômico ou outros contaminantes. Cuidados especiais devem ser tomados durante o isolamento das amostras de RNA para que estas estejam livres contaminantes (Malhotra et al., 1998).

A presença de falsos positivos tem sido apontada como um dos pontos negativos da técnica de DD-RT-PCR (Callard et al., 1994). Com os avanços da técnica, a percentagem de falsos positivos fica entre 25–50%, que não representam genes diferencialmente expressos (Malhotra et al., 1998; Liang et al., 1993). Segundo Goulao & Oliveira (2007) utilizando a técnica de DD-RT-PCR para identificar novos genes diferencialmente expressos durante o processo de maturação de maçãs, a percentagem de falsos positivos obtidos foi de 28%.

A técnica de DD-DT-PCR foi utilizada para identificar os genes diferencialmente expressos durante a interação fruto-fungo. Gonzáles-

Candelas (2003) analisaram a expressão gênica durante a interação entre maçãs 'Golden Delicious' e o fungo *Penicillium expansum*. Os autores obtiveram 26 clones parciais de ambos, fungo e fruto e 18 genes foram confirmados através da análise de 'Northern blott'. Estes autores confirmaram níveis de expressão maiores durante a interação maçã-fungo do que no controle. Dentre os genes diferencialmente expressos nessa interação foram encontrados dois genes de maçã com homologia a proteínas β -glucosidase e fosfatase 2C em resposta à inoculação. Vários genes do fungo estão relacionados a respostas adaptativas do patógeno ao ambiente.

A técnica de DD-RT-PCR também foi empregada para comparar os níveis de transcritos durante o processo de maturação de maçãs 'Mondial Gala' por Goulao & Oliveira (2007). Estes autores isolaram 927, das quais 14 foram up-regulated durante a maturação dos frutos. A análise destas seqüências revelou homologia com proteínas e genes conhecidos, dentre eles, proteínas dedo de zinco, lipoxigenases e proteínas alergênicas Mal d1. Essas proteínas podem estar associadas a processos como o metabolismo de lipídeos, a transcrição gênica e as repostas de defesa.

A identificação de genes de resistência envolvidos em resposta de defesa é importante para a elucidação de mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos. A seleção diferencial de bibliotecas de cDNA, produzidas a partir de mRNAs isolados de plantas inoculadas, tratadas com elicitores ou indutores de resistência tem sido utilizada para identificar genes relacionados à defesa em muitas interações planta-patógeno.

1.4.1. Isolamento de RNA de Plantas Frutíferas

A análise molecular das interações necessita do isolamento de RNA purificado dos tecidos da planta e/ou patógeno. Diversos protocolos já foram descritos para o isolamento de RNA de tecidos vegetais.

A maioria dos tecidos de plantas possui elevados conteúdos de polissacarídeos e polifenóis que podem co-precipitar juntamente com o RNA e inibir os ensaios a subsequentes. Durante a quebra do tecido para o isolamento do RNA, é crucial que o agente desnaturante entre em contato diretamente com o conteúdo celular no momento em que o conteúdo celular é liberado.

O isolamento de RNA de alta qualidade é essencial no processo de descoberta de novos genes e no estudo da expressão temporal de genes durante o desenvolvimento das plantas. A estabilidade da molecular do RNA e a presença de RNAses tornam essa molécula altamente suscetível a degradação. Por exemplo, tecidos provenientes de frutos maduros contem altos níveis de compostos fenólicos, polissacarídeos que contaminam o RNA purificado ou causam o baixo rendimento deste. A obtenção de RNA intacto de alta qualidade é um dos passos mais importantes nos experimentos de biologia molecular, incluindo RT-PCR.

Em plantas frutíferas, as pesquisas com biologia molecular muitas vezes são dificultadas devido à dificuldade em isolar RNA de alta qualidade devido a abundancia de compostos fenólicos, polissacarídeos, e outros compostos não identificados. Alguns protocolos utilizados na extração de RNA de frutíferas incluem precipitações com polivinilpirrolidona (PVP) solúvel e etanol (Salzman

et al., 1999), modificações do método do guanidina-tiocianato-fenol-clorofórmio (Vareli & Frangou-Lazaridis, 1996), modificações do método borato aquecido (Wan & Wilkins, 1994), e tratamentos com acetona do tecido vegetal (Schneiderbauer et al., 1991). Todavia quando esses métodos foram empregados para a extração de RNA em maçãs, kiwis e pêssegos, tecidos que contem elevados níveis de polissacarídeos e polifenóis (Mitra & Kootstra, 1993), não resultaram em RNA de qualidade ou com bandas aceitáveis, especialmente nos tecidos frescos de frutos.

A reação de PCR é amplamente utilizada devido sua alta especificidade, sensibilidade. Para amplificar ácidos nucleicos, RNA ou DNA, essas moléculas devem ser extraídas e purificadas dos demais componentes celulares que possam interferir com as reações de amplificação (Wieddbrauk et al., 1995; Aygan, 2006). Muitos processos de extração não removem suficientemente as contaminações por polifenóis e polissacarídeos, componentes que podem afetar diretamente a as reações de amplificação por PCR. Isto ocorre especificamente com os tecidos de frutos pertencentes ao gênero *Malus* e *Prunus* (Korschineck et al., 1991).

Polissacarídeos, polifenóis e metabólitos secundários de plantas, nos últimos passos da re-suspensão, após a precipitação com álcool e sais levam a formação de uma nuvem opaca e viscosa, difícil de separar do pellet de RNA. Mas em frutos, a maior contaminação pode ser em decorrência da grande quantidade de açúcares. Dal cin et al. (2005) relatou que os resultados da extração de RNA em diferentes tecidos de frutos de maçã e pêssego variam de acordo com o estágio de maturação dos frutos. A quantidade de cálcio

adicionada nas extrações foi dependente dos estádios de maturação dos frutos. Quanto maior a quantidade de açúcares presentes nos frutos, maiores a dificuldade de extração do RNA da utilização deste nas técnicas de 'Northern blot', transcrição reversa, eletroforese e purificação de do mRNA (Lopez-Gomez & Gomez-Lim, 1992; Mitra & Kootstra, 1993; Wan & Witkins, 1994). A separação dos açúcares do RNA é realizada através da precipitação com cloreto de lítio (LiCl) (Su & Gibor, 1988; Wallace, 1987), álcool (Logemann et al., 1987), etileno glicol monobutil eter (BE) ou cloreto de céσιο (CsCl) e centrifugação (Lopez-Gomez & Gomez-Lim, 1992; Mitra & Kootstra, 1993). Esses passos são demorados e incluem perigosos reagentes químicos e também podem aumentar as degradações do RNA.

1.5. Objetivos do Trabalho

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do tratamento térmico com água quente no controle das podridões em pós-colheita causadas pelos fungos *Botryosphaeria dothidea* e *Penicillium expansum*, além de caracterizar, em nível molecular, interações entre os patógenos *B. dothidea* e maçãs cv. Fuji, a fim de identificar o efeito do tratamento térmico na indução de genes de resistência.

O trabalho foi dividido em três capítulos, sendo que no capítulo dois são abordados métodos para a extração de RNA total de frutos de maçã de diferentes tecidos e em diferentes estádios de maturação. O capítulo três descreve o trabalho que teve como objetivo verificar a expressão de genes regulados durante a interação maçã-*B. dothidea*, através da técnica de

Differential Display RT-PCR. No capítulo quatro são abordados os experimentos realizados para verificar o efeito do tratamento com calor no controle pós-colheita da podridão branca e do mofo azul, em maçãs 'Fuji'. Neste último capítulo foram avaliadas a viabilidade do tratamento com calor no controle da podridão branca e do mofo azul, influência destes tratamentos nos parâmetros físico-químicos de qualidade de maçãs 'Fuji' e a expressão gênica diferencial, quando comparados os frutos tratados e não tratados com calor a 58°C por 30 segundos.

CAPÍTULO II

2. ISOLAMENTO DE RNA TOTAL DE FRUTOS DE MAÇÃ

2.1. Introdução

A maçã (*Malus domestica* Bork.) é um das espécies da família Rosaceae, a qual inclui muitos frutos comercializáveis como, por exemplo, pêra (*Pyrus communis*), morango (*Fragaria* spp.), cereja (*Prunus avium*), pêsego/nectarina (*Prunus persica*) e damasco (*Prunus armeniaca*) (Park et al., 2006).

A maçã é um pomo, ou seja, um pseudofruto. A polpa é derivada do receptáculo floral, juntamente com as bases das sépalas, pétalas e estames, com os quais os tecidos do ovário se fundem (Chitarra & Chitarra, 2005). A casca (camada de células epidermais e sub-epidermais) é completamente deferente do córtex. Na maioria das cultivares comerciais os tecidos epidermais e sub-epidermais concentram a biossíntese de pigmentos e ésteres voláteis, estes últimos, associados com os complexos aromáticos do fruto (Park et al., 2006). Como um fruto climatérico, o processo de maturação é marcado por um pico respiratório e de produção de etileno, que aumenta a degradação do amido e das paredes celulares resultando em mudanças na textura, uma das mais importantes características comerciais dos frutos (Giovannoni, 2001).

A maçã tem sido utilizada como modelo dentre as espécies frutíferas para estudos em biologia molecular de importantes características fisiológicas e bioquímicas bem como a resistência a doenças e pragas (Newcomb et al., 2006). O descobrimento dos genes envolvidos nessas características é um desafio para os pesquisadores de diferentes grupos de trabalho. Um dos fatores limitantes em experimentos de biologia molecular com frutos de maçãs é a extração de RNA de alta qualidade, e em quantidade suficiente, a partir de frutos. Este é um fator indispensável para reações de RT-PCR e a construção de bibliotecas de cDNA.

O estudo da expressão gênica em plantas frutíferas pode ser tecnicamente complicado devido a grande quantidade de polissacarídeos, polifenóis e outros metabólitos secundários que acumulam durante o amadurecimento do fruto e ou em resposta a estímulos do ambiente (Meisel et al., 2005). Estes compostos possuem a tendência de co-precipitarem com o RNA devido as suas propriedades físico-químicas similares, afetando a quantidade e a qualidade das amostras (Asif et al., 2000; Logemann et al., 1987).

A extração de RNA requer o rompimento vigoroso da célula, fazendo com que estes componentes anteriormente compartimentalizados nas organelas citoplasmáticas, se dissociem e reajam irreversivelmente com os ácidos nucléicos. Para o isolamento de RNA total puro e intacto de tecidos ricos em polissacarídeos é importante prevenir a ligação destes compostos aos ácidos nucléicos.

Tecidos de frutos de maçã possuem elevados conteúdos de polifenóis e polissacarídeos e RNAses endógenas. Os compostos fenólicos são rapidamente oxidados e formam quinonas que se ligam facilmente aos ácidos nucleicos (Loomis, 1974). As ribonucleases endógenas reduzem drasticamente a integridade do RNA, particularmente quando seu conteúdo aumenta, durante a senescência, fermentos e ataque de patógenos nos frutos. (Logemann et al., 1987; López-Gómez & Gomes-Lim, 1992; Green, 1994).

Além dos compostos fenólicos e outros metabólitos secundários, a contaminação por polissacarídeos impede a re-suspensão do RNA precipitado, interfere na quantificação baseada na absorvância, inibe reações enzimáticas e interfere com a migração eletroforética (Wilkins & Smart, 1996). Dentre os polissacarídeos encontrados em grande quantidade nos frutos de maçãs, as pectinas são os polímeros mais complexos e abundantes da parede celular primária (Willats et al., 2001), são complicadores do processo de extração de RNA. Maçãs maduras possuem uma elevada concentração de pectinas solúveis que formam géis. O gel formado pode encapsular algumas moléculas como ácidos nucleicos e proteínas, o que reduz a qualidade das extrações (Asif et al., 2006).

Até o momento, não existem “kits” comerciais específicos para a extração de RNA para este tipo de tecido. No presente estudo, foram avaliados dois métodos quanto à quantidade e à qualidade da extração de RNA total de frutos de maçã das cultivares Royal Gala e Fuji em três diferentes estágios de maturação. O primeiro método foi o de precipitação diferencial de RNA com cloreto de lítio conforme descrito por Bugos et al. (1995) com modificações e o

segundo método foi o de extração usando o “kit Concert™ Plant RNA Reagent” (Invitrogen).

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Material Vegetal

No experimento 1, no qual foram comparados os diferentes métodos em relação à quantidade e qualidade de RNA foram utilizadas maçãs das cultivares Fuji e Royal Gala, provenientes de pomares comerciais da Empresa Mercochen, de Caxias do Sul, RS. No experimento 2 foram utilizadas maçãs da cultivar Fuji em três diferentes estádios de maturação e também 3 diferentes porções de tecidos dos frutos, denominados epiderme, polpa e epiderme+polpa, também provenientes da empresa citada anteriormente. Os estádios de maturação dos frutos foram denominados: verdes- os frutos colhidos 90 dias após a plena floração; maturação ideal e senescentes, sendo os frutos desta última categoria previamente armazenados durante dez meses em atmosfera controlada (1,5% de O₂ + 0,5% de CO₂, a -0,5°C, 95% umidade relativa), e posteriormente um mês em atmosfera convencional, (-0,5°C, 95% umidade relativa).

A retirada das amostras para as extrações do RNA foi realizada com auxílio de um vazador de metal. Foram retirados pedaços de formato cilíndrico de 10 mm de diâmetro por aproximadamente 10 mm de profundidade. Nas extrações em que somente foi utilizada a epiderme, a fração polpa foi descartada com auxílio de bisturi. O mesmo ocorreu quando se utilizou somente a polpa. Depois de retiradas as amostras estas foram imediatamente

congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a temperatura de -80°C até o momento das extrações.

2.2.2. Análises Físico-químicas

Os frutos foram transportados até Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS, Porto Alegre, RS, onde foram realizadas as análises físico-químicas de acordo com a metodologia a seguir:

A firmeza da polpa foi determinada em dois pontos opostos da região equatorial de cada fruto através de um penetrômetro manual com ponteira Magness-Taylor, de 11 mm de diâmetro. Os valores foram expressos em Newton (N). Os sólidos solúveis totais foram determinados com refratômetro de mesa, e os valores expressados em graus Brix. Para a acidez total titulável de cada amostra de frutos foi coletada uma alíquota de 10 ml do suco, que diluído em 90 mL de água destilada foi, posteriormente, titulada com uma solução de NaOH a 0,1 N até pH 8,1. Os valores foram expressos em meliequivalentes de ácido málico/100 ml de suco. Para estas análises foram utilizados 3 repetições de 10 frutos por repetição.

2.2.3. Método Bugos

As amostras de frutos de maçãs foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido. Aproximadamente 400 mg do tecido triturado foi colocado em tubos de micro-centrífuga (0,5 mL). Em seguida foi adicionado 400 μl de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 200 mM, EDTA 15 mM e SDS 0,5%), 2,3 μl de mercaptoetanol, 400 μl de fenol e 80 μl de

clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e os tubos contendo as amostras foram homogeneizados em vórtex por 2 minutos. Após acrescentar 28 μ l de acetato de sódio (3M) e homogeneizar em vórtex por um minuto, as amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos, e em seguida centrifugadas a 16.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido em novo tubo, ao qual foi acrescentado 400 μ l de fenol e 80 μ l de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização em vórtex por 2 minutos e centrifugação a 16.000 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi colocado em um novo tubo, acrescentando-se a este, 500 μ l de isopropanol. As amostras foram incubadas a -20°C por uma hora, e então, centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante removido. Adicionou-se ao precipitado 500 μ l de etanol 70% e centrifugou-se a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi removido e secou-se o precipitado sob temperatura ambiente. Foram acrescentados 82,5 μ l de água ultra pura ao precipitado seguida por incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir adicionou-se LiCl₂ 8 M para uma concentração final de 2,5 M. Os tubos foram incubados durante 12 horas a 4°C. Após a centrifugação a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C e posterior descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 500 μ l de etanol 70%. A amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Esse último procedimento foi repetido mais uma vez. O precipitado permaneceu em temperatura ambiente até secar e foi ressuspenso em 30 μ L de água ultra pura. O RNA foi incubado por 10 min à temperatura ambiente antes de ser armazenado à - 20 °C.

2.2.4. Micro extração de RNA Concert™ Plant RNA Reagent

Foram pesados aproximadamente 400 mg do tecido dos frutos e em seguida triturado com nitrogênio líquido em almofariz. O pó resultante foi transferido para tubos eppendorf® de 1,5 mL, ao qual também foi adicionado 500 µL de Concert Plant RNA Reagent resfriado a 4°C, seguido de vortex. Em seguida as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Após foram centrifugadas por 2 minutos a 12000 x g, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo no qual também foi adicionado 100 µL de NaCl 5 M para clarificar o extrato e 300 µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados manualmente e centrifugados por 10 minutos a 12000 x g a 4°C, para separar as fases. A fase superior aquosa foi coletada e depositada em um novo tubo, descartando-se o restante. A este novo tubo foi adicionado igual volume de isopropanol e as amostras incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e adicionado ao tubo 1 mL de etanol a 75%, tomando o cuidado para não perder o pellet. Novamente os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 12000 x g a 4°C, e após foi desprezado o líquido tomando-se o cuidado para não perder o pellet. O RNA foi re-suspendido em 30 µL de água ultra-pura livre de RNase, e incubando por 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida armazenado -20°C.

2.2.5. Macro extração de RNA Concert™ Plant RNA Reagente

Este método utiliza os mesmos reagentes do método anterior, e somente diferem os volumes dos reagentes e a quantidade de tecido vegetal. Um 1 g de tecido vegetal foi pesado e em seguida triturado em nitrogênio líquido e colocado em tubo de 50 mL. A este tubo foram adicionados 5 mL de Concert™ Plant RNA Reagente resfriado a 4°C, seguido de vortex. Após, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, centrifugadas por 5 minutos a 2.600 x g a 4°C, para separar as fases. A fase aquosa foi passada por filtro de nylon estéril e o filtrado coletado para um novo tubo. O material restante foi descartado. Para cada 10 mL de sobrenadante filtrado foram adicionados 2 mL de NaCl 5 M e 6 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v). Em seguida os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 2.600 x g a 4°C, para separar as fases. Novamente o sobrenadante foi coletado para um novo tubo, seu volume foi medido e a este volume foram adicionados 0,9 vezes de isopropanol. Após a adição do isopropanol, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Passado este período, foram centrifugados por 30 minutos a 2.600 x g a 4°C e o sobrenadante desprezado. Ao pellet resultante foi adicionado 5 a 10 mL de etanol 75% e centrifugar a 2.600 x g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o pellet re-suspendido em 100 µL água ultra-pura livre de RNase e incubando por 10 minutos em temperatura ambiente. Após, o RNA foi transferido para tubos eppendorf® e armazenado a -20°C para posterior utilização.

2.2.6. Estimativa da Quantidade e Qualidade do RNA Total

A quantidade de RNA total foi estimada através da leitura em espectrofotômetro (SmartSpec Plus, Bio-Rad) da absorbância a 260 nm (nanômetros) (A_{260}), utilizando como padrão 1 ($A_{260}= 1$ equivale a uma concentração de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de RNA). A concentração de RNA é calculada através da fórmula: $\{\text{RNA}\} = 40\mu\text{g.mL}^{-1} \times D^* \times A_{260}$ (Brasileiro et al., 1998).

A qualidade do RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria pela relação OD260/280 nm e por eletroforese em gel de agarose (Gibco/BRL) a 1,5%, contendo tampão TBE [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H_3BO_3 e 2 mM de EDTA]. O gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado de pela análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120). O marcador de massa molecular utilizado foi o de 1 Kb de DNA (Gibco BRL).

2.2.7. RT-PCR com Oligonucleotídeos Iniciadores de Actina de Maçã

Os RNAs foram submetidos à reação da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O RNA total dos frutos foi transcrito reversamente (RT) adicionando $1,32 \mu\text{M}$ dos oligonucleotídeos iniciadores Actina – anti-senso (5'-TGGGATGACATGGAGAAGATT-3'), de 0,4 mM de cada dNTP [(dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen)]; 50 mM de Tris HCl (pH 8,3); 75 mM de KCl; 6,6 mM de DTT (ditiotretitol); 200 U da enzima transcrição reversa (MMLV-RT) (Amersham Biosciences) e água ultra pura até completar o volume de $5 \mu\text{L}$. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) por 1 hora a temperatura de 37°C .

A reação de PCR de amplificação foi composta de 5 μ L do cDNA; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM de KCl; 2 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de cada dNTP; [(dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen)], 0,8 μ M de cada um dos oligonucleotídeos (Actina – anti-senso- 5'-TGGGATGACATGGAGAAGATT-3' e actina senso 5'-CTACAAAGTCATCGTCCAGACAT-3'), 3 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 50 μ L. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 17 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 90 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos, num total de 35 ciclos.

Para a comprovação da eficiência da amplificação os produtos da reação de PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose (Gibco/BRL) a 2,0 % - contendo tampão TBE [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H_3BO_3 e 2 mM de EDTA]. O gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu g \cdot mL^{-1}$), fotografado e analisado através do sistema de foto documentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120). O marcador de massa molecular utilizado foi o de 1Kb DNA (Invitrogen).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho foram baseados no trabalho de Gasic et al. (2004), construídos com base em uma seqüência conservada do gene da actina de maçã (Apple_0902.385.C2.Contig633). Este procedimento foi adotado somente no experimento 2.

2.2.8. Análise dos Resultados

No experimento 1, quando foram comparados os dois métodos de extração de RNA total, foram utilizadas dez repetições por método, sendo cada repetição constituída por um tubo de reação, bem como na comparação da macro e micro extração.

No experimento 2 foram realizadas 10 repetições de extração para cada tipo de tecido vegetal. A variável rendimento de RNA foi avaliada através do teste DMS de Fischer.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Experimento 1

As maçãs da cv. Fuji utilizadas neste experimento 1 encontrava-se em avançado estágio de maturação. Os resultados das extrações de RNA total apresentados na Tabela 1 demonstram que para ambos métodos empregados a quantidade de RNA foi baixa, mas a quantidade de RNA obtida através do método Concert foi superior a obtida através do método Bugos.

Segundo Suzuki et al. (2003) a habilidade em isolar RNA total de boa qualidade e mRNA livre de proteínas, DNA e metabólitos secundários é um ponto crucial para a construção de bibliotecas de cDNA e análises moleculares através de RT-PCR. Um método eficiente de extração de RNA pode ser julgado pela qualidade, quantidade e integridade do RNA obtido.

A qualidade das amostras pode ser atestada através da leitura por espectrofotômetro e visualização em gel de agarose da integridade dos fragmentos de RNA ribossomal. A qualidade das amostras avaliada por

espectrofotometria apresentou uma relação 260/280 entre 1,4 e 1,6 para ambos os métodos, quando uma relação ideal seria de 1,8 a 2,0. Os géis de agarose também mostram claramente a degradação do RNA, caracterizado pelos arrastes (Figuras 5 e 6). Resultados semelhantes foram obtidos por Oster (2004) utilizando o método Bugos para a extração de RNA de maçãs.

TABELA 1. Características do RNA total de frutos de maçã cv Fuji. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Método	ug/ul ¹	260/280 ²
Bugos	0,050	1,4
Concert™	0,180	1,6

¹{RNA} = 40µg.mL⁻¹ x D* x A₂₆₀

²Razão A₂₆₀/A₂₈₀

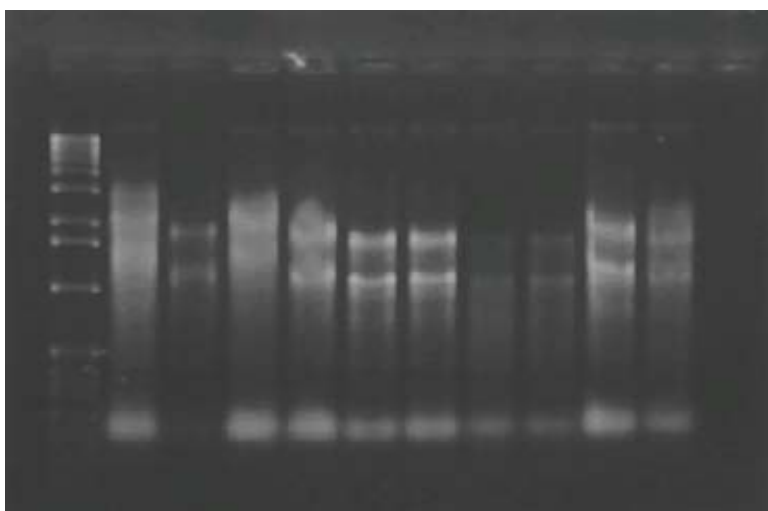


FIGURA 5. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Amostras de RNA extraídas segundo o método de RNA Concert™. Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

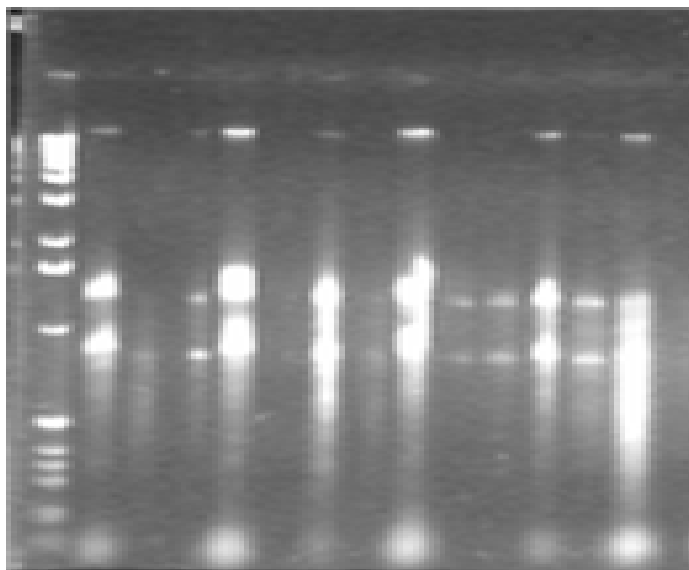


FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Amostras de RNA extraídas pelo método Bugos. Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Como o método Concert apresentou rendimento superior ao método Bugos, novos experimentos utilizando-se este reagente foram conduzidos. Visando obter informações sobre as diferenças de qualidade e quantidade de RNA total extraído dos diferentes tecidos dos frutos de maçã foram realizadas extrações das frações epiderme e da polpa dos frutos de duas cultivares diferentes, Royal Gala e Fuji.

Os resultados das extrações demonstram claramente que a fração polpa apresenta quantidade menor de RNA quando comparada à epiderme. O rendimento de RNA da polpa foi extremamente baixo, para ambas cultivares (Tabela 3). Quanto comparadas as cultivares, a quantidade de RNA das extrações da cv. Fuji foram menores do que as da cv. Royal Gala. Isto pode ser atribuído ao avançado estágio de maturação da cv. Fuji. (Tabela 2).

Quanto à qualidade do RNA, a relação 260/280 foi de 1,9 para as amostras da epiderme de ambas cultivares e de 2,0 a 2,2 para amostras da polpa. A visualização dos fragmentos de RNA ribossomal no gel de agarose demonstra a integridade das amostras provenientes da epiderme da cv. Royal Gala (Figura 7, canaletas 2 a 5). Devido à baixa quantidade nem todas as amostras da polpa foram visualizadas no gel.

TABELA 2. Características físico-químicas de frutos de maçã. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2005.

Cultivar	FP (Newtons)	SST (Brix)	ATT (Meq de ac. Málico/ 100ml)
Royal Gala	78,8	13,2	5,4
Fuji	65,0	15,0	3,5

TABELA 3. Características do RNA de frutos de maçã, obtidos através do Método Concert. LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2005.

Cultivar	Fonte do Vegetal			
	Epiderme		Polpa	
	ug/ul ¹	260/280 ²	ug/ul ¹	260/280 ²
Gala	0,22	1,9	0,07	2,2
Fuji	0,12	1,9	0,01	2,0

¹{RNA} = 40µg.mL⁻¹ x D* x A₂₆₀

²Razão A₂₆₀/A₂₈₀

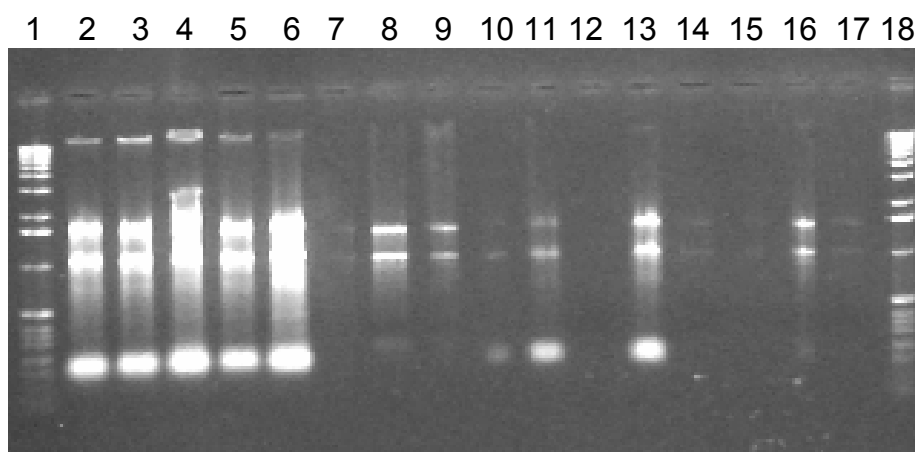


FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de epiderme de maçã cv. Gala (2 a 5), epiderme de maçãs cv. Fuji (6 a 9) e polpa de maçã cv. Gala (10 a 13) e cv. Fuji (13 a 17). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linhas 1 e 18, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2005.

Como a quantidade de RNA obtido em todas as extrações sempre foi baixa, foi testada a macro extração, utilizando o método Concert™. Nesta tentativa, foi utilizado 1 g de tecido (somente da cv. Fuji) dos frutos e as extrações realizadas em tubos de 50 mL.

Tanto a micro quanto a macro extração de RNA resultaram, na maioria das vezes, em fragmentos visíveis de RNA ribossomal no gel de agarose e a relação 260/280 foi 2,0 tanto para a micro quanto para a macro-extração (Tabela 4). Quando essas amostras foram submetidas à quantificação por espectrofotometria, a quantidade de RNA presente foi baixa e na seqüência dos processos, poucas amostras amplificaram quando submetidas à técnica de RT-PCR (dados não apresentados). A baixa quantidade de RNA pode estar ligada ao avançado estágio de maturação dos frutos utilizados no experimento. Aumentando-se a quantidade de tecido vegetal, o esperado era um aumento no rendimento de RNA, o que não ocorreu. Extrações em tubos de 50 mL são dispendiosas. Os volumes de reagentes são grandes e dificultam a manipulação, tornando-a perigosa. O reagente Concert™, é extremamente tóxico, volátil e de odor desagradável. Além disso, as degradações foram mais visíveis na macro-extração (Figuras 8 e 9).

TABELA 4. Características do RNA de maçãs cv Fuji, obtidos através do método Concert. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Extração Concert™ Plant RNA Reagent			
Micro- extração		Macro- extração	
$\mu\text{g}/\text{ul}^1$	260/280 ²	$\mu\text{g}/\text{ul}^1$	260/280 ²
0,44	2,00	0,18	2,0

¹{RNA} = $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \times D^* \times A_{260}$

²Razão A_{260}/A_{280}

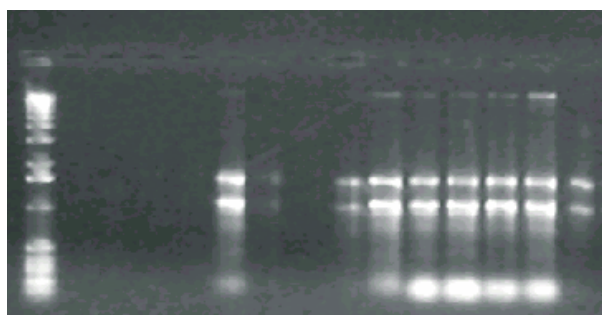


FIGURA 8: Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs 'Fuji'. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Amostras de RNA extraídas segundo o método de micro-extração RNA Concert™. Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

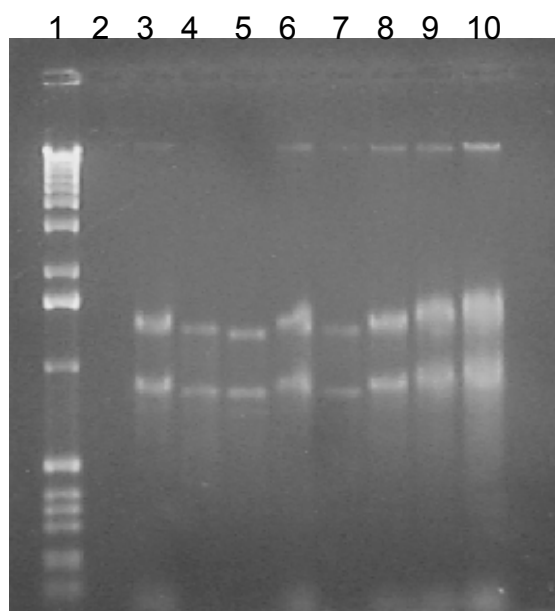


FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs 'Fuji'. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Amostras de RNA extraídas segundo o método de macro-extração Concert™. Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

2.3.2. Experimento 2

Os frutos utilizados neste experimento foram caracterizados quanto ao estágio de maturação em verdes, maturação ideal e senescentes. Foram comparados estes três estádios de maturação dos frutos na tentativa de detectar as variações que poderiam ocorrer na quantidade de RNA de acordo com o estágio de maturação. Os tecidos verdes ou em formação necessitam da síntese constante de RNA para sua formação, enquanto tecidos em estádios mais avançados de maturação são tecidos que estão morrendo e os processos de degradação estão ocorrendo em maior intensidade do que os de síntese.

As características físico-químicas dos frutos destes dois últimos estádios de maturação são apresentadas na tabela 5. Já, os frutos considerados verdes foram colhidos 90 dias após a plena floração e não tiveram suas características físico-químicas avaliadas.

TABELA 5. Características físico-químicas de maçã cv. Fuji. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2006.

Maturação	FP (Newtons)	SST (%)	ATT (Meq de ac. málico/ 100ml)
Ideal	78,8	13,2	5,4
Senescente	51,0	15,0	3,0

A escolha dos diferentes tecidos para as extrações foi devido a composição diferenciada destes. Os tecidos da epiderme possuem uma série de compostos fenólicos e antocianinas que poderiam ser potenciais interferentes no processo de extração, já a polpa é um tecido rico em polissacarídeos, incluindo as pectinas, também interferentes.

Quando comparados os dois métodos, independente do estágio de maturação dos frutos (Tabela 6), não houve diferenças significativas entre os

métodos para as extrações das frações epiderme+polpa e polpa. O método Concert apresentou maior quantidade de RNA para a fração epiderme. Quando a extração de RNA foi realizada com frutos em senescência, através do método Bugos, a quantidade de RNA obtida foi baixa. Além disso, a extração falhou para a maioria das amostras, como pode ser visualizado na Figura 10. Já, quando a extração foi realizada através do método Concert a quantidade foi maior, porém nas amostras provenientes da epiderme ocorreu degradação do RNA em praticamente todas as 10 extrações (Figura 11) e a relação 260/280 foi de 2,25 (Tabela 7).

A amplificação com oligonucleotídeos iniciadores de actina somente foi positiva nas amostras extraídas através do método Concert, da fração polpa (Figura 12) uma vez que as amostras provenientes da epiderme também não amplificaram, provavelmente devido à degradação das amostras e presença de contaminantes no RNA. Os frutos deste estágio de maturação foram armazenados em atmosfera controlada durante 10 meses. Segundo Ke et al. (1991) e Solomos & Kanellis (1999), maçãs armazenadas por vários meses a baixas temperaturas, reduzido oxigênio e elevado CO₂, sofrem uma redução em seus níveis metabólicos e em consequência uma redução no conteúdo de RNA. Além disso, os tecidos em senescência possuem elevada atividade de enzimas relacionadas a processos de degradação, como as RNases. A baixa concentração de RNA em maçãs armazenadas e o elevado conteúdo de fenóis e pectinas pode em frutos maduros prejudicar a qualidade das extrações de RNA.

TABELA 6. Quantidade de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)¹ de maçãs cv. Fuji obtidos por diferentes métodos de extração e de diferentes tecidos dos frutos. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

Método	Origem do Tecido			Médias
	Epiderme + polpa	Epiderme	Polpa	
Bugos	0,1237 bA ²	0,0780 bB	0,0950 bB	0,0989
Concert™	0,0873 bB	0,3630 aA	0,0743 bB	0,1749
Médias	0,1055	0,2205	0,0847	

¹{RNA} = $40\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \times D^* \times A_{260}$

²Médias seguidas de mesma letra minúscula (coluna) e maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer (5%).

TABELA 7. Razão 260/280 do RNA de maçãs cv Fuji, obtidos através do método Concert. LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2006.

Maturação	Origem do Tecido		
	Epiderme	Polpa	Epiderme + Polpa
	260/280	260/280	260/280
Senescente	2,25 ¹	2,20	1,90
Ideal	1,40	2,10	1,50
Verde	1,70	1,60	1,50

¹Razão A_{260}/A_{280}

TABELA 8. Razão 260/280 de amostras de RNA, de maçãs cv Fuji, obtidos através do método Bugos. LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2006.

Maturação	Origem do Tecido		
	Epiderme	Polpa	Epiderme + Polpa
	260/280 ¹	260/280	260/280
Senescente	2,28	2,10	1,80
Ideal	2,25	2,50	2,18
Verde	1,90	1,50	1,50

¹Razão A_{260}/A_{280}

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36

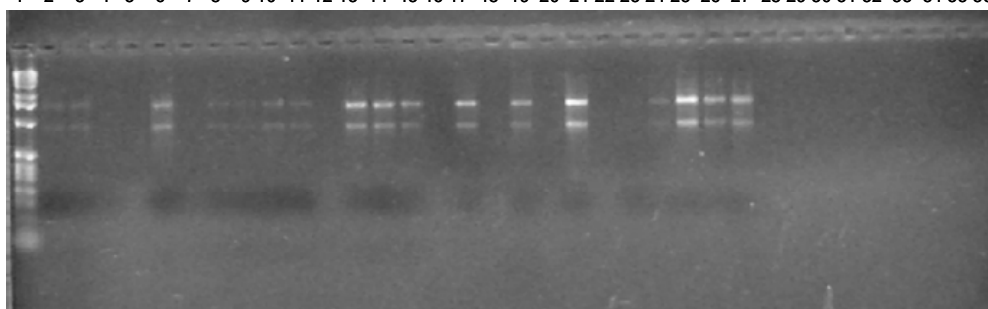


FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji no estágio de maturação senescente, método Bugos, epiderme, (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme + polpa (22 a 32). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linhas 1 e 18, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

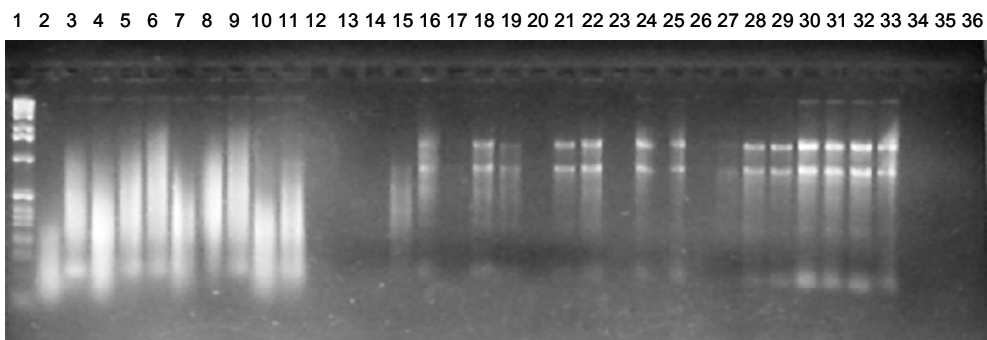


FIGURA 11. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji no estágio de maturação senescente, método Concert, epiderme (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme + polpa (22 a 31). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

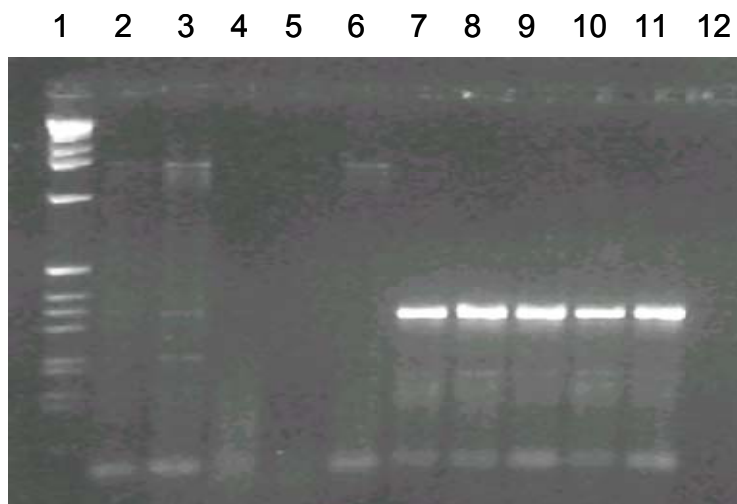


FIGURA 12. Eletroforese em gel de agarose da amplificação das amostras de RNA (Método Concert) de maçãs em estágio de maturação senescente, com oligonucleotídeos iniciadores de actina de Os fragmentos foram separados em gel de agarose (2,0%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

Para as extrações realizadas com frutos no estágio ideal de maturação, o método Bugos foi mais eficiente do que o método Concert (Figuras 13 e 14) e (Tabela 10). Ambos os métodos apresentaram baixa quantidade de RNA. Quanto à qualidade das amostras, (Tabelas 7 e 8) a relação 260/280 variou de 1,40 a 2,10 para o método Concert e de 2,18 a 2,50 para o método Bugos,

indicando que podem ter ocorrido contaminações com fenóis e proteínas. Em quase todas as amostras obtidas da fração epiderme pelo método Concert ocorreram degradações e os demais tecidos não apresentaram fragmentos de RNA no gel de agarose (Figura 8). A amplificação com oligonucleotídeos iniciadores de actina somente ocorreu com as amostras da fração epiderme+polpa, extraídas através do método Bugos (dados não apresentados).



FIGURA 13. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji, estágio de maturação ideal, método Bugos, epiderme (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme+polpa (22 a 31). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.



FIGURA 14. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji, estágio de maturação ideal, método Concert, epiderme (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme +polpa (22 a 31). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

O rendimento de extração foi maior em todos os tecidos provenientes de frutos verdes, sendo que a epiderme demonstrou um rendimento

significativamente superior à polpa e epiderme+polpa. Para ambos os métodos de extração utilizados, a qualidade e a quantidade de RNA nos frutos verdes foram superiores aos demais estádios de maturação. A integridade dos fragmentos de RNA também podem ser observados nos géis (Figuras 15 e 16). Quanto amplificadas com oligonucleotídeos de actina todas as amostras foram positivas (Figura 17).

É importante observar a redução da quantidade de RNA com o avanço da maturação principalmente quando se compara o rendimento de extração da epiderme e da polpa dos frutos verdes com os dois outros estádios de maturação. Parece haver um requerimento absoluto e contínuo da síntese de proteínas para o amadurecimento dos frutos, sendo a síntese de ácidos nucléicos pronunciada nas primeiras etapas da maturação (Chitarra & Chitarra, 2005). Já em frutos em estágio avançado de maturação os processos de degradação superam os de síntese refletindo na quantidade de RNA disponível (Giovanoni, 2001).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

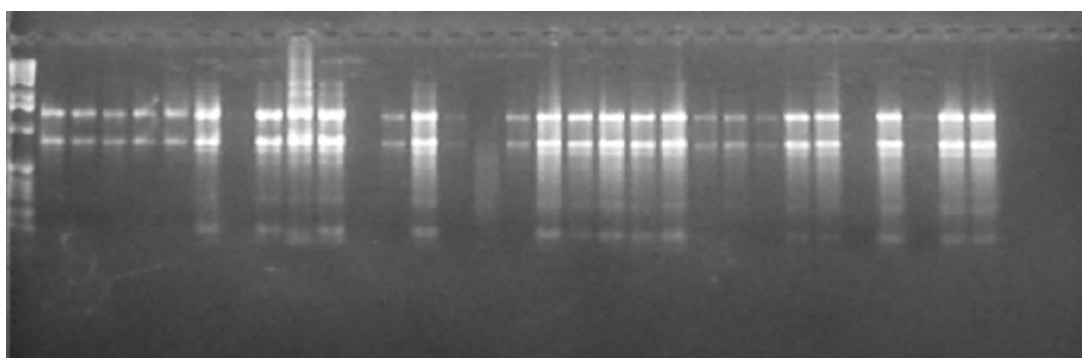


FIGURA 15. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji, estágio de maturação verde, método Bugos, epiderme (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme +polpa (22 a 31). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

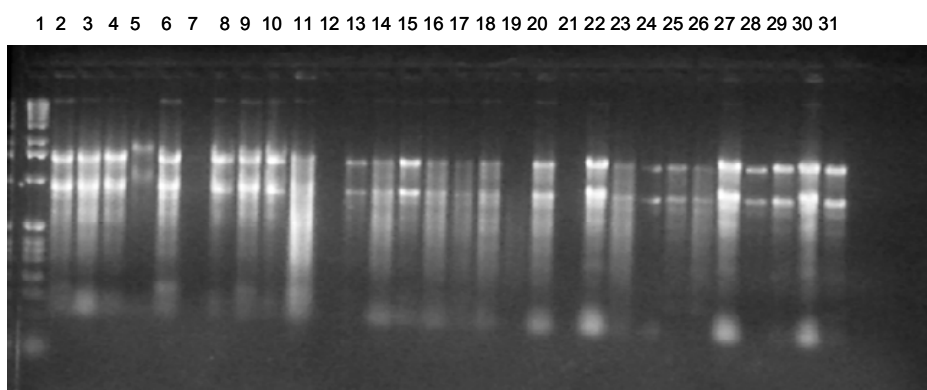


FIGURA 16. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de maçãs cv. Fuji, estágio de maturação verde, método Concert, epiderme (2 a 11), polpa (12 a 21) e epiderme + polpa (22 a 31). O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

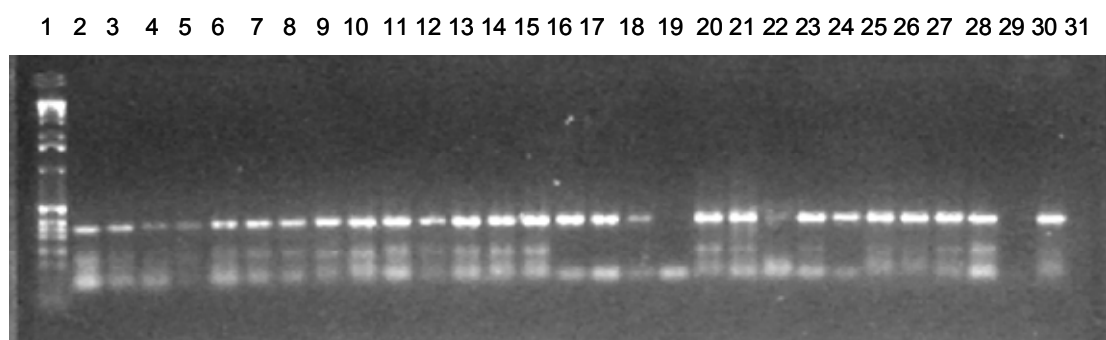


FIGURA 17. Eletroforese em gel de agarose da amplificação com oligonucleotídeo iniciadores de actina de amostras de RNA. Método Bugos (2 a 15) e Concert (16 a 31) de maçãs em estágio de maturação verde. Os fragmentos foram separados em gel de agarose (2,0%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linha 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

Ao compararmos o rendimento de RNA das diferentes fontes do vegetal nos três estádios de maturação (tabela 9), observa-se que a maior fonte de RNA é na epiderme (0,2205 μ g/ μ l). Este tecido do fruto de maçã é completamente diferenciado dos tecidos do córtex e inúmeras seqüências de eventos bioquímicos ocorrem neste local, como a síntese de pigmentos e compostos aromáticos (Park et al., 2006). Também observamos que os frutos verdes contem maior concentração de RNA nos três tecidos estudados.

TABELA 9. Quantidade de RNA (ug/ul)¹ de maçãs cv. Fuji nos diferentes tecidos dos frutos. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

Maturação	Origem do Tecido			Médias
	Epiderme + polpa	Epiderme	Polpa	
Verdes	0,1355 aB ²	0,3415 aA	0,1825 aB	0,2198
Ideal	0,1325 aA	0,1360 bA	0,0450 bB	0,1045
Senescente	0,0485 bB	0,1840 bA	0,0265 bB	0,0850
Médias	0,1055	0,2205	0,0847	

¹{RNA} = 40µg.mL⁻¹ x D* x A₂₆₀

²Médias seguidas de mesma letra minúscula (coluna) e maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer (5%).

Quando comparamos os diferentes métodos de extração e os estádios de maturação dos frutos, observa-se que o método Concert apresentou a maior quantidade de RNA (tabela 10), mas não diferiu do método Bugos quando os frutos encontravam-se no estágio maturação ideal.

TABELA 10. Quantidade de RNA (ug/ul)¹ de maçãs cv. Fuji quando comparados os métodos Bugos e Concert. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

Método	Maturação			Médias
	Verde	Ideal	Senescente	
Bugos	0,1580 bA ²	0,1230 aA	0,0157 bB	0,0989
Concert™	0,2817 aA	0,0860 aB	0,1570 aB	0,1749
Médias	0,2198	0,1045	0,0863	

¹{RNA} = 40µg.mL⁻¹ x D* x A₂₆₀

²Médias seguidas de mesma letra minúscula (coluna) e maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer (5%).

A qualidade do RNA foi maior quando utilizado o método de Concert e frutos verdes. A baixa concentração de RNA em maçãs senescentes e o elevado conteúdo de fenóis e pectinas em frutos maduros podem ser causa do baixo rendimento das extrações de RNA destes frutos. Os melhores resultados obtidos de frutos senescentes foram com as extrações realizadas da epiderme. Asif et al. (2006) aborda em seu trabalho a importância da elevada quantidade de pectinas presentes na polpa de maçãs. Com o avanço da maturação, o conteúdo de pectinas solúveis na polpa aumenta podendo formar géis que interferem na extração do RNA reduzindo a quantidade e a qualidade do

mesmo. Hulme et al. (1971) relataram que a síntese de RNA em maçãs atinge o máximo nos estádios iniciais da maturação dos frutos. Lay-Yee et al. (1991) correlacionando índices de maturação e produção de RNA, não encontram diferenças significativas no rendimento de extração de RNA de maçãs em quatro diferentes estádios de maturação. Entretanto este autor indica que as mudanças nos níveis de RNA e proteínas coincidem com o aumento das concentrações do etileno interno, aumento do teor de sólidos solúveis totais e diminuição dos índices da firmeza de polpa.

Os resultados das análises estatísticas revelaram que não houve interação tripla, ou seja, entre método, tipo de tecido e época de amostragem. Também segundo a análise, o método Concert demonstrou ser mais eficiente na extração de RNA da epiderme, sendo superior ao método Bugos. A vantagem deste reagente é a rapidez na extração, cerca de 2 horas de trabalho para cada bateria de amostras. O alto custo do reagente pode ser apresentado como uma desvantagem do mesmo.

Quando comparamos a eficiência da extração dos métodos observamos que o método Concert oferece maior eficiência quando o tecido for a epiderme e o método Bugos oferece maior eficiência quando o tecido for a polpa. De maneira geral, a quantidade de RNA obtida através do método Concert foi maior do que a obtida através do método Bugos.

CAPÍTULO III

3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA INTERAÇÃO ENTRE MAÇÃS CV. FUJI E *BOTRYOSPHAERIA DOTHIDEA*

3.1. Introdução

A maçã é a fruta de clima temperado de maior importância comercial como fruta fresca, sendo reconhecida pelos consumidores devido ao seu sabor e atributos nutricionais, (Zohary & Hopf, 2000). Um grande problema desta cultura são as podridões em pós-colheita, responsáveis por até 35% das perdas de frutos, quando submetidas a manejo inadequado durante o período de armazenamento. Fungos são os principais agentes causadores de podridões em maçãs nesta fase. *Botryosphaeria dothidea* é o fungo causador da podridão branca em maçãs. A incidência desta podridão tem aumentado nas últimas safras gerando a necessidade do melhor entendimento do comportamento desta doença, principalmente na cv. Fuji e seus clones. Sabe-se que o fungo pode infectar os frutos no início do ciclo vegetativo, permanecendo latente até o início da maturação, podendo a podridão desenvolver-se também sob refrigeração.

O estabelecimento da doença envolve uma complexa interação entre patógeno e hospedeiro, envolvendo processos no fungo, como ativação de mecanismos de penetração e colonização do hospedeiro e no fruto a ativação

das respostas de defesa. A identificação de genes de resistência envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação de mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos.

As interações planta-patógeno são caracterizadas por mudanças na expressão gênica de ambos organismos. A seleção de genes nos hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de defesa da planta contra os fitopatógenos. A seleção diferencial de bibliotecas de cDNA, produzidas a partir de mRNAs isolados de plantas inoculadas, tratadas com elicitores ou indutores de resistência tem sido utilizada para identificar genes relacionados a defesa em muitas interações planta-patógeno.

Diversas metodologias são usadas para a identificação e isolamento de genes expressos diferencialmente. Entre as metodologias que mais se destacam hoje estão a Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH), o cDNA-AFLP, o DD-RT-PCR ("differential display reverse transcriptase"- PCR), e os micro arranjos de cDNA (Freeman et al., 2000). Esta última técnica, apesar de proporcionar volume muito grande de informações, quando comparada com as demais técnicas, é bastante cara, o que limita seu uso em muitos laboratórios. A técnica DD-RT-PCR, entretanto, apesar de gerar menor volume de informações que os micro-arranjos de DNA é relativamente de baixo custo e de fácil implementação. A técnica foi apresentada pela primeira vez em 1992 (Liang & Pardee, 1992), e tem assumido uma grande importância no descobrimento de novos genes envolvidos em vários processos metabólicos tanto em plantas quanto em animais (Wilkinson et al., 1995). A técnica é

baseada de Differential-display RT-PCR (DD-RT-PCR) é um método baseado em PCR que permite a análise da expressão gênica entre diferentes populações de células. O método de DD-RT-PCR pode ser utilizado no estudo das interações patógeno-hospedeiro, resultando na identificação de genes regulados durante a infecção com fungos (Benito et al., 1996) e bactérias (Sheehaus & Tenhaken, 1998). Segundo estes autores a técnica é rápida e sensível para a identificação de alterações funcionais resultantes de diferenças na transcrição ou degradação do mRNA. A técnica constitui-se dos seguintes passos, obtenção de RNA, produção de cDNA através da transcrição reversa do mRNA (RT), amplificação do cDNA por PCR, separação e seleção visual de cDNAs amplificados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Os fragmentos de cDNAs são recuperados do gel, re-amplificados por PCR, clonados e seqüenciados (Shoham et al., 1999).

Este estudo foi realizado visando caracterizar em nível molecular a interação entre o patógeno *B. dothidea* e maçãs cv. Fuji, tendo por meta identificar o processo de infecção e as respostas do fruto ao patógeno.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Material Vegetal

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Pós-colheita do Departamento de Horticultura e Silvicultura e no Laboratório de Fitopatologia Molecular (LFM) do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Frutos de maçã da cv. Fuji provenientes da Empresa

Mercochem de Caxias do Sul, RS, foram transportados até o Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita/UFRGS.

3.2.2. Produção do Inóculo de *B. dothidea*

O inóculo do fungo *B. dothidea* foi obtido a partir de maçãs cv. Fuji com sintomas típicos de podridão branca, provenientes de pomares comerciais da região de Caxias do Sul, RS. Os isolados foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e cultivados em câmara de crescimento a 26°C sob luz contínua (lâmpada fluorescente) durante sete dias. Para a produção de conídios, os isolados de *B. dothidea* foram repicados em discos de papel filtro sobre o meio de cultura BDA nas placas de Petri, permanecendo por 15 dias a 26°C sob luz fluorescente constante. Após este período, os papéis filtro foram retirados das placas e triturados, em almofariz, juntamente, com 20 mL de caldo batata-dextrose (BD) estéril a 5%. A suspensão obtida foi filtrada através de três camadas de gaze para a remoção dos resíduos de micélio do patógeno.

3.2.3. Inoculação dos Frutos

Os frutos foram desinfestados em solução hipoclorito de sódio a 1,0% por 30 segundos e em seguida feridos com bisturi estéril e inoculados com uma suspensão de 10^6 conídios.mL⁻¹ de *B. dothidea*. Após a inoculação, as maçãs foram incubadas em câmara de crescimento a 26°C. Amostras de tecido de maçãs inoculadas e não inoculadas foram coletadas logo após a inoculação e após, 3, 12, 48 e 72 horas e armazenadas a -80°C para análises posteriores. Os tratamentos foram:

- T1 - frutos não inoculados;
- T2 - 3 horas após a inoculação;
- T3 - 12 horas após a inoculação;
- T4 - 48 horas após a inoculação;
- T5 - 72 horas após a inoculação.

3.2.4. Isolamento de RNA

O RNA total foi extraído a partir de 400mg de tecido dos frutos de acordo com o método Concert™ Plant RNA Reagent Invitrogen®. Foram realizadas 3 repetições de cada tratamento.

A qualidade do RNA é determinada então através das razões A_{260}/A_{280} . A concentração de RNA foi calculada através da fórmula $\{\text{RNA}\} = 40\mu\text{g.mL}^{-1} \times D^* \times A_{260}$ (Brasileiro et al., 1998):

3.2.5. RT-PCR com Oligonucleotídeos Iniciadores de Actina de Maçã

Para testar a qualidade do RNA foi amplificando-o com oligonucleotídeos iniciadores baseados no gene de actina de maçã: actina – sentido (5'-CTACAAAGTCATCGTCCAGACAT-3') e actina – anti-senso (5'-TGGGATGACATGGAGAAGATT-3'). As reações de transcrição reversa e PCR seguem as mesmas condições descritas abaixo.

3.2.6. Differential Display RT-PCR

As extrações de RNA e análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia Molecular (LFM) do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Os RNAs foram submetidos à reação da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O RNA total dos frutos (1 a 2 μg) foi transcrito reversamente (RT) adicionando 1,32 μM de cada um dos oligonucleotídeos ancoras (Tabela 11), de 0,4 mM de cada dNTP [(dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen)]; 50 mM de Tris HCl (pH 8,3); 75 mM de KCl; 6,6 mM de DTT (ditiotreitól); 200 U da enzima transcrição reversa (MMLV-RT) (Amersham Biosciences) e água ultra pura até completar o volume de 5 μL . A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) por 1 hora a temperatura de 37°C.

A reação de PCR de amplificação foi composta de 5 μL do cDNA; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM de KCl; 2 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de cada dNTP; [(dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen)], 0,8 μM de cada um dos oligonucleotídeos ancora, 0,8 μM de cada um dos nucleotídeos arbitrário (Tabela 11), 3 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 50 μL . No total foram 15 combinações de oligonucleotídeos.

A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 17 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 90 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos, num total de 39 ciclos.

Para a comprovação da eficiência da amplificação os produtos da reação de PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose (Gibco/BRL) a 2,0% - contendo tampão TBE [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90

mM de H₃BO₃ e 2 mM de EDTA]. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹), fotografado e analisado através do sistema de foto documentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120). O marcador de massa molecular utilizado foi o de 1Kb DNA (Invitrogen).

TABELA 11. Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores baseados no trabalho de Sanches-Torres & Gonzalez-Candelas, (2003). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Oligonucleotídeos Iniciadores	Seqüência 5'—3'
Ancoras	
AP31	TTC GGA TCC CCA TTT TTT TTT TTA
AP32	TTC GGA TCC CCA TTT TTT TTT TTC
AP33-	TTC GGA TCC CCA TTT TTT TTT TTG
Arbitrários	
AP51	TCT GAA TTC CCT CAA CGA GG
AP52	TCT GAA TTC CCT CAT TGG TC
AP53	TCT GAA TTC CCT CAC CAA TC
AP54	TCT GAA TTC CCT CAT ACA GG
AP55	TCT GAA TTC CCT CGT CAT AG

3.2.7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% (0,8% de acrilamida, 19,46 mM de N,N-metabisalacrilamida, 7 M de uréia, 90 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, 4,4 mM de persulfato de amônio e 3,9 mM de N,N,N,N- tetrametiletilenodiamino (TEMED)). A eletroforese do gel foi realizada no sistema de seqüenciamento Hoefer™ SQ3 (Pharmacia Biosciences). As condições da eletroforese foram de 50 Watts por aproximadamente 5 h a 45-50°C. As amostras foram incubadas a 95°C por 3 minutos antes da aplicação no gel de eletroforese.

Para os sistemas de coloração e revelação foram utilizados nitrato de prata e carbonato de sódio anidro, respectivamente, conforme método Silver

Sequence™. A placa contendo gel foi imersa em ácido acético 10% e incubada por 20 min. Seguiram-se três lavagens com água destilada por 2 minutos e o gel foi imerso em solução de coloração (6 mM de AgNO₃ e 0,055% de formaldeído) durante 30 minutos, sob agitação constante, em temperatura ambiente. Após a lavagem durante 21 segundos com água destilada a coloração foi revelada com a imersão da placa em solução resfriada (10°C) de carbonato de sódio anidro (0,28 M de Na₂CO₃, 0,055% de formaldeído e 1,2 µM de tiosulfato de sódio) , sob agitação constante. A reação foi interrompida através da adição de ácido acético glacial 10%. O gel foi fotografado através do sistema de foto-documentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120).

3.2.8. Isolamento de cDNAs

Os fragmentos de interesse foram isolados do gel através do método proposto por Song et al., (1995). Cada fragmento coletado foi eluído em 10 µL de água ultra-pura e em seguida submetido à temperatura de 90°C por 30 minutos em banho-maria.

3.2.9. Re-amplificação

Os fragmentos foram coletados, eluídos e submetidos a uma re-amplificação pela PCR utilizando os mesmos iniciadores e as mesmas condições da amplificação. Os produtos da re-amplificação foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose 2% (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120).

3.2.10. Purificação de Fragmentos

Após a reação de re-amplificação as amostras foram quantificadas através de espectrofotômetro e então submetidas à purificação com as enzimas ExoSAP-IT® (usb®), pela incubação a 37°C por 15 minutos, seguido de 80°C por 15 minutos, conforme orientações do fornecedor.

3.2.11. Seqüenciamento.

Os fragmentos foram seqüenciados no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUC/RS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), através do sistema “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis Systems” no seqüenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences), utilizando 100 ng do produto de PCR e 0,25 µM do oligonucleotídeo iniciador E-0 e seguindo as instruções do fornecedor.

3.2.12. Análise de similaridade de seqüências

As seqüências obtidas do seqüenciamento foram analisadas através do programa Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências de nucleotídeos (BLASTn) e proteínas (BLASTx), (Basic Local Alignment Search Tool), disponíveis no banco de dados americano do National Center for Biotechnology Information – NCBI- (GenBank) (www.ncbi.nlm.nih.gov.)

3.2.13. RT-PCR com Oligonucleotídeos Iniciadores Metalotionina Tipo 2

A partir das seqüências de metalotioninas (Met) tipo2 de *Malus domestica* depositadas no GenBank foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para confirmar a presença deste gene nos diferentes tratamentos:

Met 1 Senso- 3' TGT CGT CGT GCT GCG GTG GTA AAT G 5'

Met 1- Anti-senso 3' CAG GGG TTG CAG GTG CGA TTG TC 5'

A reação de transcrição reversa foi conduzida conforme as condições descritas para a RT, apenas com a modificação dos oligonucleotídeos iniciadores substituindo pelos acima descritos. A reação de PCR também seguiu as mesmas condições do PCR descrito anteriormente, e as condições deste foram as seguintes: a desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 2 minutos, a desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 55°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 90 segundos e a extensão final a 72°C por 5 minutos, num total de 39 ciclos.

3.3. Resultados e discussão

O RNA total extraído dos frutos de maçã apresentou concentrações entre 1,5 e 2,0 µg/µl (Tabela 12). Todas as amostras apresentaram dois fragmentos visíveis em gel de agarose, com poucos sinais de degradação (Figura 18). Quando amplificado com oligonucleotídeos iniciadores de actina todas as amostras de RNA amplificaram (Figura 19).

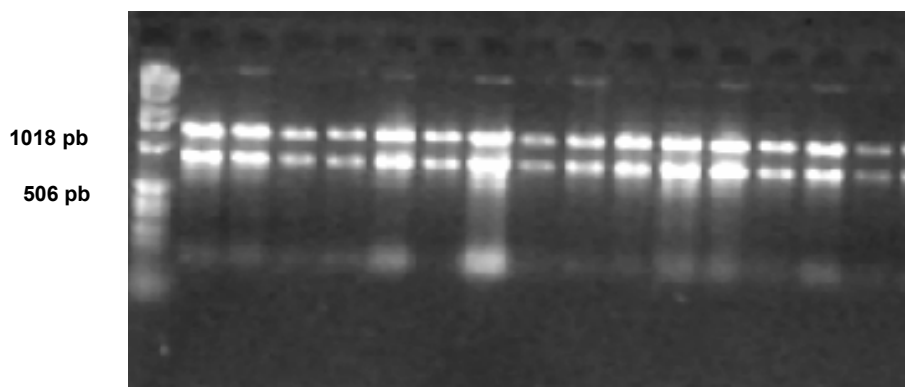


FIGURA 18. Eletroforese em gel de agarose do RNA total maçãs cv. Fuji. (2 a 4), T1, (5 a 7) T2, (8 a 10) T3 (11 a 13) T4 e (14 a 16) T5. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Linhas 1, marcador 1Kb (Gibco BRL). LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2005.

TABELA 12. Qualidade e quantidade de RNA total isolado de maçãs, cv Fuji. LFM/UFRGS. Porto Alegre, RS, 2005.

Tratamento	$\mu\text{g}/\mu\text{l}^1$	$260/280^2$
T1- controle	2,0	1,8
T2- 3 horas	1,8	1,9
T3- 12 horas	1,9	1,8
T4- 48 horas	1,5	1,8
T5- 72 horas	2,0	2,0

$$^1\{\text{RNA}\} = 40\mu\text{g}.\text{mL}^{-1} \times D^* \times A_{260}$$

$$^2\text{Razão } A_{260}/A_{280}$$

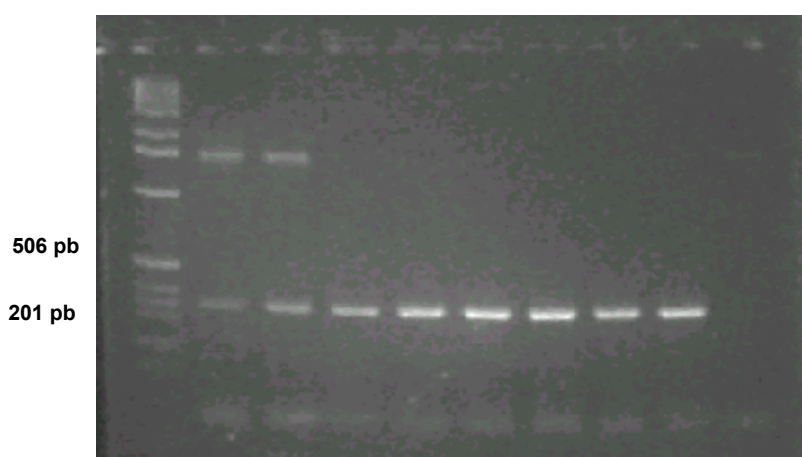


FIGURA 19. Perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação por PCR com primers de actina, separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Marcador 1 Kb. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

Na figura 20 é apresentado o perfil de amplificação da técnica de DD-RT-PCR. Os produtos da reação foram fragmentos de tamanho entre 550 e 200 pares de base. A corrida em gel de poliacrilamida permitiu a separação destes fragmentos possibilitando o isolamento e re-amplificação dos mesmos. Através da utilização de 15 combinações de oligonucleotídeos iniciadores foi possível identificar em gel de poliacrilamida quatrocentos fragmentos de cDNAs. Estes fragmentos de cDNA isolados são correspondentes a genes diferencialmente expressos ou seja, que tiveram sua expressão aumentada ou reprimida quando comparados os cinco tratamentos lado a lado. Isto permite a identificação do conjunto de genes diferencialmente expressos por uma célula, tecido ou organismo, em uma determinada condição em relação à outra com a qual se deseja comparar. No caso deste trabalho foram comparados cinco tratamentos. O controle, não inoculado versus 4 tempos a após a inoculação.

Os géis de poliacrilamida foram analisados visualmente e através destes foram coletados quatrocentos fragmentos, eluídos e re-amplificados e visualizados em gel de agarose a 2%. Dos quatrocentos fragmentos isolados, duzentos foram re-amplificados (Figuras 21 e 22). Pode-se notar através destes géis de re-amplificação que a maioria dos fragmentos apresentou tamanho menor do que 500pb.

Cento e vinte produtos foram purificados, seqüenciados e as seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados americano do National Center for Biotechnology Information – NCBI (GenBank) (www.ncbi.nlm.nih.gov) através dos programas BLASTn e BLASTx (Basic Local Alignment Search Toll). De acordo com estas análises realizadas, destas cento

e vinte seqüências, trinta não apresentaram similaridade com nenhuma outra seqüência depositada no banco e quatorze seqüências apresentaram similaridade com metalotioninas do tipo 2 (Mets) de *Malus domestica*. Duas outras seqüências apresentaram similaridade com proteínas de *M. domestica*, uma seqüência foi similar a proteína hipotética de resistência de domínio CC-NBS-LRR e outra similar a uma profilina alergênica. Também foi encontrada similaridade com uma proteína fosfatase induzida por ácido abscísico e cálcio de *Fagus sylvatica* e duas proteínas hipotéticas SHOOT2 (*Glycine max*), conforme apresentado nas tabelas 13 e 14.

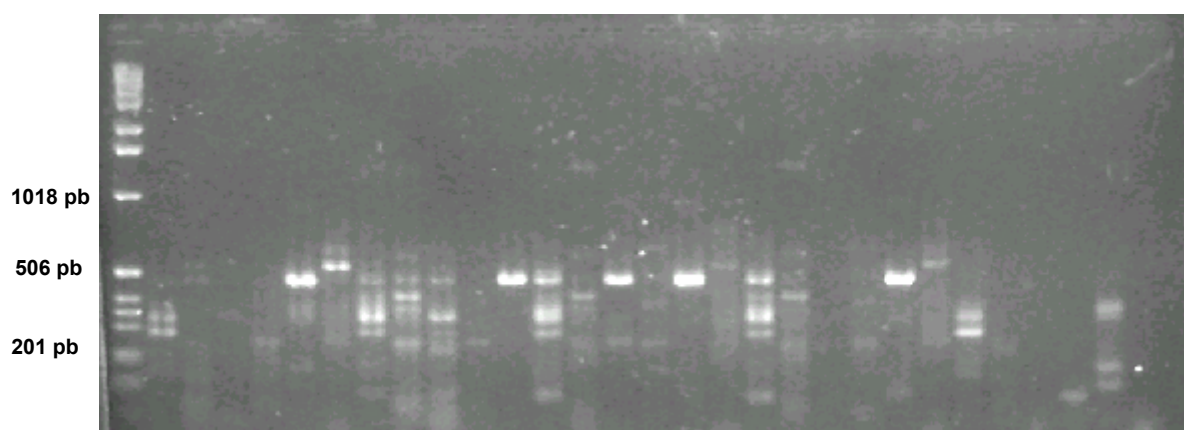


FIGURA 20. Perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação DD-RT-PCR com diferentes combinações de oligonucleotídeos, separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Marcador 1 Kb, LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

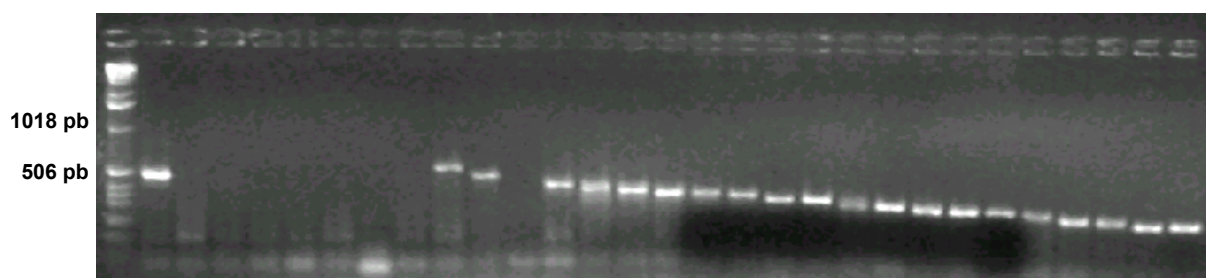


FIGURA 21. Produtos de re-amplificação por PCR de fragmentos diferencialmente expressos coletados do gel de poliacrilamida, separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Marcador 1Kb. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

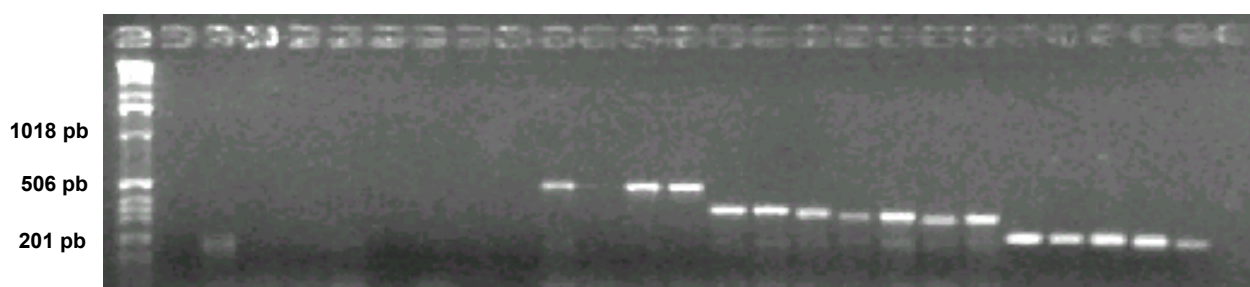


FIGURA 22. Produtos de re-amplificação por PCR de fragmentos diferencialmente expressos coletados do gel de poliacrilamida, separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Marcador 1Kb. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

TABELA 13. Análise da similaridade de fragmentos seqüenciados isolados através da técnica de DD-RT-PCR na interação entre *B. dothidea* e frutos de maçã, através do programa Blast N. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Trat.	Acesso	Tam (pb)	Acesso	Valor de E
3	AY277667	879	Metalotionina AMT1 (<i>Malus domestica</i>)	1×10^{-5}
4	AY277667	512	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	3×10^{-54}
4	U61973	511	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	1×10^{-50}
4	DQ341382	468	18S ribosomal RNA gene, (<i>M. domestica</i>)	7×10^{-154}
2	AJ277744	807	Proteína fosfatase (<i>Fagus sylvatica</i>)	3×10^{-25}
1	AY277667	514	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	2×10^{-59}
5	U61973	319	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	7×10^{-107}
5	U61973	865	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	1×10^{-89}
4	U61973	267	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	4×10^{-114}
4	U61973	890	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	7×10^{-97}
5	U61973	751	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	4×10^{-24}
4	U61973	451	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	0.0
5	AJ507459	355	Profilina alergênica (<i>M. domestica</i>)	5×10^{-43}
5	U61973	645	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	0.0
2	AJ507459	355	profilina alergênica (<i>M. domestica</i>)	5×10^{-43}
4	AM167520	306	PR CC-NBS-LRR (<i>M. domestica</i>)	3×10^{-75}
5	U61973	450	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	5×10^{-133}
4	AY642930	256	OPB18 SCAR marker seq (<i>M. sieversii</i>)	2×10^{-05}
1	AF350328	255	Proteína hipotética SHOOT2 (<i>Glycine max</i>)	7×10^{-17}
1	U61973	452	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	2×10^{-129}
1	DQ008806	213	Qiu 94044 subunidade ribossomal (<i>Dioscorea</i> sp)	5×10^{-73}
1	AF350328	257	Proteína hipotética SHOOT2 (<i>G. max</i>)	4×10^{-15}
3	U61973	433	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	0.0

TABELA 14. Análise da similaridade de fragmentos seqüenciados isolados através da técnica de DD-RT-PCR na interação entre *B. dothidea* e frutos de maçã, através do programa Blast X. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Trat.	Acesso	Tam (pb)	Proteína	Valor de E
1, 3, 4 e 5	U61973	511	Metalotionina AMT1 (<i>M. domestica</i>)	1×10^{-50}
2	AJ277744	807	Proteína fosfatase 2C (PP2C) (<i>Fagus sylvatica</i>)	3×10^{-25}
2 e 5	AJ507459	355	Profilina alergênica (<i>M. domestica</i>)	5×10^{-43}
4	AM167520	306	PR CC-NBS-LRR (<i>M. domestica</i>)	3×10^{-75}
1	AF350328	255	Proteína hipotética SHOOT2 (<i>G. max</i>)	7×10^{-17}

A função de cada proteína encontrada através destas comparações foi revisada. Como foram encontrados maior número de fragmentos de proteínas Mets, a confirmação da expressão destas foi realizada através da RT-PCR com oligonucleotídeos específicos pra Mets do tipo 2. O resultado desta amplificação demonstrou a ocorrência do gene em todos os tratamentos, no controle, não inoculado e também nos frutos inoculados. (dados não apresentados)

3.3.1. Metalotioninas do Tipo 2

Metalotioninas (Mets) são polipeptídios ricos em resíduos de cisteínas e estão envolvidos na detoxificação de metais e na homeostase, em ambos, procariotos e eucariotos. Esses resíduos de cisteína ligam-se a metais como cobre, zinco e cádmio (Hamer, 1986). Em plantas, os genes de metalotioninas, são super-expressos em resposta a metais pesados (van Hoof et al., 2001), senescência (Buchanan-Wollaston, 1994; Chen et al., 2003), abscisão induzida por etileno (Coupe et al., 1995), estresse por seca ou sal (Oztur et al., 2002), estresse por luz (Dunaeva & Adamska, 2001), infecção a nematóides (Potenza et al., 2001), necrose induzida por patógeno, (Butt et al., 1998), ácido abscísico

(Chatthai et al., 1997; Reynolds & Crawford, 1996), ferimentos (Choi et al., 1996) e estresse por frio (Reid & Ross, 1997). Mets ajudam a manter estáveis as concentrações de íons metálicos nas células vegetais. Quando as Mets se ligam a metais, formam complexos que diminuem a toxicidade destes. Mets também podem atuar como faxineiras, seqüestrando os radicais livres e diminuindo os danos oxidativos nos tecidos.

Neste trabalho, em resposta a inoculação com *Botryosphaeria dothidea*, foram encontrados clones com alta similaridade a metalotioninas do tipo 2 de *M. domestica*. Esses genes foram encontrados tanto no controle como nos frutos inoculados. A amplificação por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para Met 2, confirmou este resultado, portanto estes genes provavelmente não foram expressos em resposta a inoculação por *B. dothidea*. Reid & Ross, (1997) encontraram esse tipo de Mets em frutos de maçã em resposta ao armazenamento refrigerado. Os frutos utilizados neste experimento foram previamente submetidos ao armazenamento em câmaras frias, como forma habitual de conservação e redução do processo de maturação. Estes genes podem ter sido expressos como resposta as condições de frio durante o armazenamento. A análise da expressão de um gene Met 2 em *Brassica napus* demonstrou que este era expresso em todos os estádios de desenvolvimento da folha, mas os níveis de transcritos aumentaram de maneira regular conforme o avanço da senescência (Buchanan-Wollaston & Ainsworth, 1997).

Em um trabalho recente, Degenhardt (2006), encontrou um grande número de clones de Mets do tipo 3 (91 de 262) em uma biblioteca de cDNAs

de folhas de macieiras da cv. Remo, resistente ao fungo causador da sarna da macieira (*Venturia inaequalis*). O aumento da expressão dos transcritos de Mets também ocorreu após a infecção com o fungo *V. inaequalis*, na cultivar Elstar, suscetível a sarna. Segundo a autora, a expressão constitutiva dessas Mets na cultivar resistente a *V. inaequalis* poderia ser o fator de proteção a diferentes patógenos.

Segundo Butt et al, (1998) o gene *LSC54* que codifica para uma proteína Met está envolvido na morte celular em resposta a *Pseudomonas syringae*, um patógeno necrotrófico. A função exata das Mets durante a interação não está bem clara, mas poderia estar envolvida na proteção dos tecidos atacados, tentando minimizar os danos ocasionados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio no local da infecção. Em abacaxi, Moyle et al. (2005), também faz referencia a ligação potencial da super expressão de Mets durante várias respostas a estresse e a sua abundância em frutos de abacaxi na fase de senescência. O autor atribui a super expressão dessas proteínas Met em decorrência de estresse oxidativo. Espécies de oxigênio reativo acumulam durante as condições de estresse como ferimentos, abscisão, necroses, infecção por patógenos, estresse por seca ou sais, e os múltiplos genes de Mets estariam envolvidos na detoxificação dos radicais livres destes tecidos (Moyle et al., 2005).

3.3.2. Proteína de Resistência NBS-LRR-CC

Outro fragmento de interesse isolado foi similar à proteína de resistência NBS-LRR-CC (sítio de ligação a nucleotídeo, repetições ricas em leucina e

coiled coil) de *M. domestica*. Este fragmento foi diferencialmente expresso em frutos inoculados, e ocorreu no tratamento quarenta e oito horas após a inoculação. A classe de proteínas NBS-LRR-CC é bastante estudada, uma vez que são codificadas por um grande número de genes em plantas (McHale et al., 2006). Existem aproximadamente cento e cinquenta genes que codificam para NBS-LRR em *Arabidopsis thaliana* e mais de quatrocentos em *Oryza sativa* (Agrawal, 2000).

As proteínas NBS-LRR atuam através de uma rede de sinalização, induzindo uma série de mecanismos de defesa nas plantas, como a ativação da explosão oxidativa, o fluxo de íons de cálcio, e as cascatas de proteínas quinases associadas à indução de genes relacionados à patogênese e reposta de hipersensibilidade (Van der Biezen & Jones, 1998; Peyyala & Farman, 2006). Essas proteínas conferem resistência a uma ampla gama de patógenos incluindo bactérias, fungos, viroses, e nematóides (Wang et al., 1999).

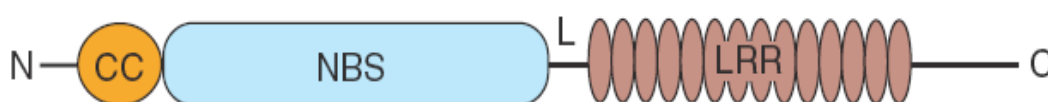


FIGURA 23. Os domínios das proteínas NBS-LRR. N: amino terminal, CC: domínio coiled-coil; NBS: nucleotídeo de ligação; L: ligante; LRR: domínio de repetições ricas em leucina, C terminal. (Adaptado de Mchale, et al., 2006).

A região NBS da proteína desencadeia a ativação de rotas de sinalização que levam às respostas de resistência a doenças nas plantas hospedeiras (Van der Biezen et al., 1998), enquanto os domínios LRR funcionam primeiramente no reconhecimento dos elicitores (Jones & Jones 1997). O domínio NBS é caracterizado por diferentes motifs, todos eles altamente conservados entre as espécies (Staskawicz et al., 1993). Através

destas regiões conservadas foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores amplificar análogos de genes de resistência (RGA) em diferentes espécies de plantas Speulman et al. (1998), Timmerman-Vaughan et al. (2000). Em *M. domestica* os RGAs foram utilizados por Lee et al. (2003), Baldi et al. (2004) e Calenge et al. (2005). Seqüências RGA juntamente com as informações de ESTs possibilitam a criação de um modelo de estudo para avaliar a dinâmica dos genes NBS-LRR (Pan et al., 2000; Cannon et al., 2002) em plantas.

O trabalho desenvolvido por Lee et al., (2003), demonstrou que existe um alto grau de diversidade entre os RGAs de macieiras do tipo selvagem e nas cultivadas. Os RGAs codificantes para NBS, de maçãs apresentaram considerável variação entre as seqüências, todavia, muitas destas seqüências possuem alta similaridade com outros genes NBS-LRR. As famílias mais comuns, detectadas por hibridização nos tipos selvagens também estão presentes nas espécies cultivadas de maçã.

Baldi et al. (2004) em seu trabalho isolou mais de cinquenta fragmentos genômicos homólogos a genes NBS-LRR, mas somente dezoito destes puderam ser mapeados. Segundo este mesmo autor, provavelmente muitas outras seqüências NBS-LRR estão presentes no genoma da macieira, e a localização destes homólogos de NBS-LRR poderia acelerar a identificação de regiões genômicas contendo genes de resistência funcionais.

Em um trabalho recente, desenvolvido por Calenge et al. (2005), foram identificados quarenta e três marcadores através do perfil NBS. Após o seqüenciamento, vinte e três marcadores apresentaram similaridade com

RGAs, baseado na homologia de seqüência de genes de resistência conhecidos ou seqüências NBS/LRR.

Se a tolerância ao patógeno é desenvolvida, certamente a seleção para a resistência é diminuída e altera o efeito do patógeno na evolução da planta. A resistência a doenças mediada pelos domínios NB-LRR, somente é efetiva contra patógenos biotróficos ou hemibiotróficos, mas não contra patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005). O fragmento encontrado neste trabalho em resposta a *B. dothidea*, um patógeno necrotrófico, quarenta e oito horas após a inoculação.

Em maçãs, até o momento 12 genes maiores foram identificados para a resistência a doenças, mas principalmente para patógenos biotróficos como a sarna (*V. inaequalis*) (Be naouf & Parisi, 2000; Durel et al., 2003; Hemmat et al., 2002; Patocchi et al., 2004; Tartarini et al., 1999), e também para a resistência a míldio (*Podosphaeria leucotricha*) (Evans & James, 2003), mas até o momento somente um gene de resistência foi isolado e seqüenciado nesta espécie: o gene HcrVf2, que pertence a classe dos genes de resistência Cf (Belfanti et al., 2004). Segundo Baldi et al, (2004), a identificação e mapeamento de RGAs em *Malus* sp pode ser o caminho para o descobrimento de novos genes relacionados a resistência de doenças.

3.3.3. Proteína Fosfatase 2C (PP2C)

A seqüência de aminoácidos de um fragmento submetido a inoculação, demonstrou similaridade considerável a proteína fosfatase 2C (PP2C) de *Fagus sylvatica*. Proteínas fosfatases 2C (PP2C) são uma classe de proteínas conservadas ricas em serina/treonina, envolvidas primeiramente em resposta a

estresses (Vranova et al., 2000). As fosfatase PP2C atuam como reguladores negativos em diferentes rotas de sinalização, dentre elas, a resposta a ferimentos mediada por ácido abscísico (ABA) (Carrera & Prat, 1998) ou a sinalização a estresse induzida por MAP-quinase (Meskiene et al., 1998). A fosforilação de proteínas é o principal mecanismo através do qual, animais e plantas regulam os processos celulares. Em particular, a fosforilação e desfosforilação de proteínas e enzimas regulatórias é o mecanismo geral de transmissão de sinais do ambiente extracelular para o interior da célula. Proteínas fosfatases, em ação contrária as proteínas quinases, promovem a regulação e reversibilidade dos mecanismos fosforegulatórios. As proteínas fosfatases da família PP2C são enzimas que requerem Mg^{2+} ou Mn^{2+} e são reguladores negativos das cascatas de proteínas quinases, ativadas em resposta a estresses (Leube et al., 1998).

Muitos genes que codificam para PP2Cs foram isolados de plantas (Rodriguez, 1998; Kapranov et al., 1999; Miyazaki et al., 1999). A análise das seqüências de membros da família PP2C indica a existência até então de 7 classes diferentes de PP2Cs de plantas (Miyazaki et al., 1999). A maioria dos PP2Cs isoladas estão relacionadas a transdução de sinais de ácido abscísico (ABA).

Inúmeras proteínas fosfatase pertencentes a esta mesma classe (PP2C) foram encontradas em maçãs submetidas à inoculação por *Penicillium expansum* no trabalho desenvolvido por Sanches-Torres & Gonzalez-Candelas (2003). Estes observaram a presença de elevados níveis de expressão de transcritos para essa proteína somente em frutos inoculados, representando

uma resposta específica dos frutos ao patógeno. Homólogos do gene PP2C também foram encontrados em cultura de células de tabaco portando o gene de resistência *Cf-9*, quando inoculadas com a *Cladosporium fulvum* (Durrant et al., 2000) e em espiguetas de trigo infectadas com *Fusarium graminearum* (Kruger et al., 2002), mas segundo estes autores a função desta enzima durante a interação planta-patógeno não é conhecida.

Plantas de *Arabidopsis* que super expressam este gene de *F. sylvatica* *FsPP2C2* demonstraram elevada sensibilidade ao ABA e estresse abióticos e menor grau de dormência de sementes quando comparadas com as sementes e plântulas do tipo selvagem. Adicionalmente, plantas transformadas demonstraram um fenótipo anão, com folhas verde-escuras e atraso no florescimento. Esses efeitos foram revertidos pela aplicação de GA₃. A proteína foi localizada no núcleo e ABA é o sinal que direciona está para núcleo.

3.3.4. Profilina Alergênica

Com a utilização da técnica de DD-RT-PCR foi possível o isolamento de um fragmento que mostrou similaridade com o gene Mal d4 de *M. domestica*, através de comparação por BlastX. Este fragmento foi isolado de frutos, setenta e duas horas após a inoculação.

O gene Mal d 4 é responsável pela codificação de proteínas alergênicas de maçãs, denominadas profilinas. As profilinas são proteínas pequenas (12-16 kd), presentes nos organismos eucarióticos, cuja função principal é regular alterações na estrutura do citoesqueleto e ligar-se a actina (G-actina) na razão de 1:1 regulando a polimerização da actina em filamentos. Em altas concentrações previnem a polimerização da actina, mas em baixa aumentam a

polimerização. Além disso, existem evidências de que as profilinas atuam como centro de controle de complexas interações moleculares, pois interagem com inúmeras proteínas, sendo que a importância destas funções está começando a ser estudada (Witke, 2004).

As profilinas normalmente localizam-se no citoplasma, mas também podem ser encontradas no núcleo (Braun et al., 1999; Holzinger et al., 2002; Valster et al., 2003). Quando o conteúdo de profilinas é aumentado artificialmente no citoplasma, ocorre uma despolimerização dos filamentos de actina e rapidamente ocorrem alterações na morfologia e na dinâmica deste. A função das profilinas no núcleo é desconhecida, porém Baluska et al, (2001) especula que estas podem estar envolvidas na transdução de sinais entre o núcleo e o citoplasma. Um trabalho recente de Schütz et al, (2006) demonstrou que após a infecção por fungos ou oomicetos ocorre a indução da polimerização dos filamentos de actina na membrana plasmática, localizando o local da penetração do patógeno na parede celular.

A família multigênica que codifica as profilinas pode ser agrupada em duas classes: uma classe formada por genes constitutivamente expressos nos tecidos vegetativos e outra classe de genes expressos principalmente em tecidos reprodutivos. Múltiplas isoformas de profilinas podem ser expressas simultaneamente em tecidos e células individuais (Huang et al., 1996). As funções biológicas básicas das profilinas são: alongação celular, manutenção do formato celular, florescimento (Ramachandran et al., 2000), desenvolvimento de sementes (McKinney et al., 2001) e crescimento do tubo polínico (McKenna et al., 2004).

O foco de estudo das profilinas é o fato destas serem potentes alergênicos, principalmente quando presentes no pólen e nos frutos. Além destes órgãos, as profilinas podem ser encontradas em sementes, nozes e no látex das plantas (Witke, 2004). Atualmente, genes de profilinas de inúmeras espécies vegetais foram seqüenciados e suas seqüências de aminoácidos deduzidas. As características da proteína são altamente conservadas, com relação ao tamanho (131 a 134 AA), domínios e estrutura (Radauer & Hoffmann-Sommergruber, 2004). Genes para profilinas alergênicas foram encontrados em frutos de laranja (*Citrus sinensis*), banana (*Musa acuminata*), abacaxi (*Ananas comosus*), pêsego (*Prunus persica*), pêra (*Pyrus comunis*), cereja (*Prunus ceracus*), amêndoa (*Prunus dulcis*), avelã (*Corylus avellana*) dentre outras plantas (Asturias et al., 1998); (Kleber-Janke et al., 1999), (Reindl et al., 2002); (Rodriguez-Perez et al., 2003) e (Willerroider, 2003).

Em *M. domestica* existem vinte e duas seqüências que codificam para profilinas disponíveis, até o momento, no GenBank/EMBL. Destas, seis foram isoladas de frutos (AF129426, AF129427, AF129428, CAD46559, CAD46560, CAD46561), treze de folhas jovens (AAX19852, AAX19853, AAX19854, AAX19855, AAX19856, AAX19857, AAX19858, AAX19859, AAX19860, AAX19861, AAX19862, AAX19863, AAX19864) e três do pólen (Q9XF40, Q9XF41, Q9XF42). Todas as profilinas de maçã possuem uma seqüência codificante de 396 nucleotídeos e dois introns em posições conservadas. Os três exons possuem o mesmo tamanho (123, 138 e 135 nucleotídeos). Essas características estão presentes na maioria dos genes que codificam para profilinas em plantas, como milho, pêra, cereja e pêsego (Gao et al., 2005).

Maçãs possuem quatro classes de proteínas alergênicas, sendo denominadas, Mal d1, Mal d2, Mal d3 e Mal d4. Mal d1 é uma PR10. A expressão deste gene foi detectada em frutos maduros de maçã, e também nas folhas, em resposta a inoculação com o fungo *Venturia inaequalis*. Mal d 2 é uma proteína do tipo taumatina que pertence a classe das PR5 e está envolvida nas respostas de defesas da plantas contra patógenos de origem fúngica. Esta atividade já foi comprovada sobre os fungos patogênicos *Fusarium oxysporum* e *Penicillium expansum*. As profilinas alergênicas em maçãs são codificadas pelo gene Mal d 4. Até o momento não existe nenhum trabalho relacionando estas profilinas a respostas de defesa em frutos de maçã, mas outras profilinas conhecidas como a Bet v 1 (*Betula alleghaniensis*) atuam nas respostas de defesa a patógenos (Beuning et., 2004). Ambas Bet v 1 e Mal d 1 são classificadas como pertencentes à classe das PR10, devido sua homologia com estas proteínas (Liu & Ekramoddoullah, 2003). Trabalhos adicionais são necessários para verificar a expressão das profilinas de maçã em resposta a patógenos.

A técnica de DD-RT-PCR permitiu o isolamento de genes diferencialmente expressos durante a interação maçã-*B. dothidea*. As comparações das seqüências obtidas com as seqüências depositadas no GenBank, demonstraram que esses genes são provenientes de plantas. Entretanto, não foram encontradas seqüências com similaridade a genes fúngicos. Das quatro proteínas diferencialmente expressas, três estão relacionadas com funções de respostas de defesa a estresse e foram isoladas nos frutos inoculados. Fica, assim, evidente a necessidade de estudos

posteriores para determinar o envolvimento dessas proteínas nas respostas de defesa dos frutos a *B. dothidea*.

CAPÍTULO IV

4. TRATAMENTO TÉRMICO NO CONTROLE PÓS-COLHEITA DA PODRIDÃO BRANCA E DO MOFO AZUL EM MAÇÃS CULTIVAR FUJI

4.1. Introdução

Fungos são os principais responsáveis por perdas em pós-colheita de maçãs (*Malus domestica* Borkh) durante o armazenamento. Dentre os fungos que atacam maçãs na fase pós-colheita destacam-se o *Penicillium* spp. (Bonetti & Katsurayama, 1998), agente causa do mofo azul e *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr) Ces. & De Not), agente causal da podridão branca. A podridão branca é uma doença de ocorrência comum nas regiões produtoras de maçã de clima quente. O patógeno pode causar perdas expressivas, podendo chegar à totalidade dos frutos armazenados (Brown & Britton, 1986).

O fungo *B. dothidea* sobrevive de uma safra para outra em cancrios de ramos e troncos, além de frutos mumificados. Na primavera ocorre a liberação de ascosporos e/ou conídios, os quais irão infectar os frutos em desenvolvimento (Sutton, 1990). Parker & Sutton (1993) demonstraram que a infecção pode ocorrer em qualquer período após a queda das pétalas, sempre que as condições ambientais se tornem favoráveis ao desenvolvimento da doença. Esta doença tem uma fase latente e, por isso, frutos infetados, assintomáticos na colheita, podem continuar a desenvolver a podridão sob

refrigeração. As lesões tornam-se visíveis somente entre seis e oito semanas antes da colheita (Bonetti & Katsurayama, 1998). Segundo Kohn & Hendrix (1983) o processo da doença se inicia quando os teores de sólidos solúveis totais nos frutos atingem os 10,5 °Brix.

O mofo azul é a principal doença fungica em maçãs e pêras armazenadas. Dentre as espécies de *Penicillium* isoladas em frutos com sintomas desta doença, *P. expansum* (Link.) é um das mais comuns em maçãs e pode causar entre 70% e 80% das podridões em frutos armazenados (Vinãs et al., 1993). Além disso, esta espécie é o principal produtor da micotoxina patulina, uma toxina genotóxica com habilidade para induzir danos oxidativos no DNA de células humanas (Liu et al., 2003). No Brasil, este fungo é considerado o principal agente causador de podridões durante o armazenamento de maçãs e, se encontra difundido em todas as regiões produtoras (Bleicher & Bernardi, 1985), causando perdas de até 30% nas frutas armazenadas (Sanhueza, 1991). Conídios de *P. expansum* penetram através de ferimentos e micro-ferimentos, ocasionados pela colheita e manuseio dos frutos (Spotts et al., 1998), mas também podem penetrar através das lenticelas, da região do pedúnculo e do cálice aberto (Amiri & Bompeix, 2005).

O sintoma característico do mofo azul é uma podridão mole e aquosa. A superfície das podridões mais antigas pode estar coberta por esporos de coloração verde-claros, inicialmente brancos. *P. expansum* é um fungo psicrófilo, ou seja, desenvolve-se bem em temperaturas de 0°C e eventualmente pode crescer em temperaturas de -2°C a -3°C (Pitt & Hocking

1997), temperaturas comumente utilizadas durante o armazenamento dos frutos.

O controle químico é o método mais utilizado para o controle de doenças em frutos, tanto em pré-colheita como em pós-colheita. Todavia, a utilização de fungicidas sintéticos em pós-colheita está proibida na União Européia, principal destino das exportações brasileira de frutos, e no Brasil nos frutos produzidos no sistema de produção integrada. Além das proibições, existe uma demanda crescente de redução do uso de agroquímicos devido aos riscos de contaminação ambiental e danos a saúde humana. Outros fatores que limitam a aplicação de fungicidas em pós-colheita são a presença de resíduos destes nos frutos e o desenvolvimento de resistência de alguns patógenos aos fungicidas. A ocorrência de isolados resistentes de *P. expansum* tem sido relatada em trabalhos como os de Spotts & Cervantes, (1986) e Lennox & Spotts, (2003). Além disso, não existem fungicidas registrados para inúmeras espécies de frutas e os fungos de pós-colheita continuam causando perdas significativas.

Algumas técnicas reduzem a incidência de podridões em pós-colheita, e ajudam no controle dos patógenos. O emprego do armazenamento em baixas temperaturas ou em atmosfera controlada (AC) diminui a incidência de podridões, uma vez que os patógenos têm sua atividade reduzida em baixas temperaturas. O efeito positivo destas técnicas, entre outros, resulta do retardamento do metabolismo do fruto e, conseqüentemente, do amadurecimento, senescência, e da inibição do crescimento de fungos (Agar et al., 1990).

O tratamento térmico é uma tecnologia segura, e é utilizada visando o controle de doenças em pós-colheita em várias espécies (Fallik, 2004). Os tratamentos com calor podem controlar patógenos pela desnaturação de proteínas, liberação de lipídios, destruição de hormônios, hipoxia de tecido, redução de reservas ou injúrias metabólicas (Barkai-Golan & Phillips, 1991). Ainda, segundo Kays (1991), as altas temperaturas podem causar efeitos indiretos, tais como a inibição da síntese de pigmentos, escurecimento da epiderme e colapso de proteínas. Em adição ao possível efeito letal do aumento da temperatura no patógeno, há um número variado de interações planta-patógeno que podem explicar o decréscimo da podridão (Ferguson et al., 2000). Desta forma, a termoterapia pode ser efetiva na redução da doença através da indução de mecanismos de defesa no hospedeiro, tais como: materiais constitutivos, síntese de fitoalexinas e proteínas. O tratamento com calor é um estresse, e, sendo assim, o tecido vegetal responde na tentativa de aliviar e/ou reparar o dano causado pelo estresse (Lurie, 1998).

O tratamento térmico visando o controle de patógenos já foi testado em diversas espécies de frutos, tais como: laranja (Couey, 1989), pêssegos (Phillips & Austin, 1982; Karabulut, 2002), nectarinas (Anthony et al., 1989) e pêras (Schirra et al., 1999). Em maçãs inúmeros trabalhos foram desenvolvidos por Burchill. (1964), Sams et al. (1993), Roy et al. (1994), Lurie (1998); Fallik et al. (2001).

Os resultados com maçãs dependem da cultivar em estudo e do patógeno causador da doença. Em frutos 'Golden Delicious' expostos a 38°C durante 4 dias após a inoculação com *P. expansum*, a ocorrência de podridões

foi reduzida, após 3 meses de armazenamento a 0°C, sem reduzir a qualidade dos frutos (Leverentz et al., 2000). Para esta mesma cultivar a aspersão de água a 55°C durante 15 segundos, antes do armazenamento, reduziu significativamente o desenvolvimento de podridões, mantendo a qualidade dos frutos após quatro meses de armazenamento (Fallik et al., 2001). Podridões em maçãs causadas por *Colletotrichum acutatum* também tiveram redução através da aplicação deste mesmo método (Janisiewicz et al., 2003).

No Brasil, Lunardi et al. (2002), Lunardi et al. (2003), Oster, (2004) e Oster et al. (2006) desenvolveram trabalhos sobre o efeito do tratamento com calor no controle pós-colheita da podridão branca e na qualidade de maçãs 'Fuji'. Lunardi et al. (2002) e Lunardi et al. (2003) verificaram que a imersão de maçãs 'Fuji', inoculadas artificialmente com *B. dothidea*, em água a 47°C, 49°C e 52°C, durante 1, 2 ou 3 minutos, não controlou eficientemente a podridão causada por este patógeno. Com relação às características qualitativas das maçãs, os autores observaram que o tratamento com calor reduziu a acidez titulável, aumentou os teores de sólidos solúveis totais e pouco influenciou a firmeza da polpa. Segundo Oster (2004), quando as maçãs foram inoculadas artificialmente com o patógeno *B. dothidea*, a menor percentagem de infecção ocorreu nos frutos tratados com água quente a 58°C durante 60 segundos.

Oster et al. (2006) aplicando calor por aspersão nas temperaturas de 55°C ou 58°C por 30 segundos demonstrou que o tratamento reduziu a percentagem de maçãs com os sintomas típicos da podridão branca, bem como o número de lesões em cada fruto.

O tratamento térmico afeta diversos aspectos do processo de maturação dos frutos, como a produção de etileno e a degradação das paredes celulares, provavelmente através da alteração da expressão gênica e da síntese de proteínas (Lurie, 1998). Durante a aplicação de um estresse térmico, a expressão de muitos genes housekeeping e relacionados com a maturação diminuem consideravelmente, enquanto a expressão de genes correspondentes a proteínas de choque térmico (HSP) aumenta (Picton & Grierson, (1988) e Lurie et al. (1996). Segundo Saltveit, (1997) essa diversificação na síntese de proteínas, mais do que a acumulação das HSPs são efeitos fisiológicos do estresse por calor. Além disso, o choque térmico pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), seguido da produção de *scavengers* desses oxigênios reativos como as enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalases Holmberg & Bülow, (1998) e Mittler et al. (2004).

O tratamento térmico inibe rotas metabólicas envolvidas na maturação e outros processos em frutas e vegetais (Paull & Chen, 2000). O calor pode inibir a dispersão do patógeno através da indução de mecanismos de defesa nas camadas superficiais do epicarpo Dettori et al. (1996), Ben-Yehoshua et al. (1995) e D'hallewin et al. (1994). O tratamento de pomelos com aspersão de água aquecida a 62 C e escovas durante 20 segundos induziu resistência a *P. digitatum*, quando os frutos foram inoculados 1 a 3 dias após o tratamento, mas menos efetivo quando os frutos foram inoculados no mesmo dia do tratamento ou 7 dias após (Porat et al., 2000). Também utilizando o sistema de escovas e água aquecida a 52 C, Fallik et al. (2002) demonstrou um aumento da

resistência a *Botrytis cinerea* em tomates inoculados 24 horas após o tratamento. A resistência foi menos pronunciada quando os frutos foram inoculados 6 horas após o tratamento e não ocorreram nos frutos inoculados 48 horas após o tratamento.

Segundo Pavoncello et al. (2001), o tratamento térmico induziu o acúmulo de proteínas como glucanases e quitinases, as quais fazem parte de um complexo mecanismo de resistência dos frutos. O modo de ação do tratamento térmico em reduzir as podridões em limões está relacionado com a inibição do crescimento do patógeno devido à resposta de resistência. Os mecanismos de resistência elicitados nos frutos inoculados e subsequentemente tratados incluem a rápida produção de lignina no local da inoculação, seguida do acúmulo das fitoalexinas escoparone e escopolitina (Nafussi et al., 2001).

Estudos da expressão gênica em resposta ao calor têm revelado diversos genes induzidos pelo tratamento térmico relacionados com a proteção dos tecidos dos frutos aos danos de frio. Segundo Porat et al. (2002) o tratamento térmico em pomelos, induziu a expressão de genes que levaram ao aumento da tolerância ao estresse por frio e também de dextrina em laranjas e pomelos (Porat et al., 2004). Porat et al. (2000) sugeriram que o tratamento com calor induziu a biogênese de PRs como a quitinase e a β - 1,3 glucanase em pomelos 'Star Ruby' e que conferiu maior resistência contra o patógeno *P. digitatum*.

O entendimento das respostas de defesa dos frutos aos patógenos e ao estresse causados pelo calor ainda é bastante restrito. Poucas são as

informações sobre o processo de interação fruto-patógeno. A identificação de genes de resistência envolvidos em resposta de defesa é importante para a elucidação de mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos. A seleção diferencial de bibliotecas de cDNA, produzidas a partir de mRNAs isolados de plantas inoculadas, tratadas com elicitores ou indutores de resistência tem sido utilizada para identificar genes relacionados à defesa em muitas interações planta-patógeno.

Uma metodologia que permite o isolamento destes genes diferencialmente expressos é o differential display DD-RT-PCR, técnica desenvolvida por Liang & Pardee (1992). Esta técnica pode ser aplicada para estudar as interações planta-patógeno, resultando na identificação de genes que são 'upregulated' durante a interação com fungos Benito et al, (1996), bactérias Seehaus & Tenhaken, (1998), viroses Geri et al. (1999) e nematóides Hermsmeier et al. (2000). Neste trabalho foi utilizada a técnica de DD-RT-PCR na tentativa de isolar genes dos frutos de maçã em resposta ao tratamento térmico e a inoculação com *B. dothidea* visando o melhor entendimento dos mecanismos de defesa elicitados pelo tratamento térmico.

Avaliar a eficiência do tratamento térmico com água quente no controle das podridões em pós-colheita causadas pelos fungos *B. dothidea* e *P. expansum* e identificar genes envolvidos na resposta ao tratamento térmico foram os objetivos deste trabalho.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Material vegetal

Foram utilizadas maçãs da cv Fuji, provenientes da Empresa Mercochen, do município de Caxias do Sul, RS. Os frutos foram classificados e padronizados quanto ao calibre e a categoria (Cat 1, calibre 120g).

Os frutos foram transportados até laboratório de Horticultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS, Porto Alegre, RS, onde foram realizadas as seguintes análises físico-químicas:

- a) Firmeza da polpa: determinada em dois pontos opostos da região equatorial de cada fruto através de um penetrômetro manual com ponteira Magness-Taylor, de 11mm de diâmetro. Os valores foram expressos em Newton (N).
- b) Sólidos solúveis totais: determinados com refratômetro de mesa, sendo os valores expressados em graus Brix de açúcares;
- c) Acidez titulável: de cada amostra de frutos foi coletada uma alíquota de 10 ml do suco, que diluído em 90 mL de água destilada foi, posteriormente, titulada com uma solução de NaOH a 0,1 N até pH 8,1. Os valores foram expressos em meq ácido málico/100 ml de suco.

4.2.2. Produção do Inóculo dos Fungos

O inóculo do fungo *B. dothidea* foi obtido a partir de maçãs cv. Fuji com sintomas típicos de podridão branca, provenientes de pomares comerciais da região de Caxias do Sul, RS. Os isolados foram colocados em placas de Petri

contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e cultivados em câmara de crescimento a 26°C sob luz contínua (lâmpada fluorescente) durante sete dias.

Para a produção de conídios, os isolados de *B. dothidea* foram repicados em discos de papel filtro sobre o meio de cultura BDA nas placas de Petri, permanecendo por 15 dias a 26°C sob luz fluorescente constante. Após este período, os papéis filtro foram retirados das placas e triturados, em almofariz, juntamente, com 20 mL de caldo batata-dextrose (BD) estéril a 5%. A suspensão obtida foi filtrada através de 3 camadas de gaze para a remoção dos resíduos de micélio do patógeno.

O fungo *P. expansum* foi isolado de maçãs cv. Fuji com sintomas típicos de mofo azul. Os isolados foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido do antibiótico estreptomicina (100µg. ml) e cultivados em câmara de crescimento a 26°C na ausência de luz durante sete dias. Para o preparo da suspensão contendo o inóculo, a superfície das placas contendo as colônias foi lavada com uma solução de Tween a 0,001%. A suspensão de esporos então foi filtrada em gaze estéril e a concentração de esporos ajustada em hemacitômetro para 10^5 conídios/mL de *P. expansum*.

4.2.3. Inoculação dos Frutos

Os frutos foram desinfetados em solução hipoclorito de sódio a 1,0% por 30 segundos, em seguida foram feridos (0,2cm) com bisturi estéril e inoculados com 25 µL de uma suspensão de 10^6 conídios/mL de *B. dothidea* ou 10^5 conídios/mL de *P. expansum*, em equadores opostos. Após a

inoculação, os frutos foram incubados em câmara de crescimento a 26°C durante 72 horas quando inoculados com *B. dothidea* ou 48 horas quando inoculados com *P. expansum*.

4.2.4. Tratamento Térmico

A termoterapia foi aplicada através do processo de aspersão com água aquecida à temperatura de 58°C durante 30 segundos em um protótipo desenvolvido na Faculdade de Agronomia da UFRGS (Figuras 24 e 25). Este protótipo é constituído de parte de uma máquina classificadora, na qual foram acoplados bicos para a aspersão da água aquecida. Os bicos de aspersão do tipo leque (Marca Jacto, mod. 110-SF-015) distanciados entre si em 10 cm. A distância entre a saída da água do bico e o fruto foi de 5 cm.



FIGURA 24. Detalhe do equipamento para aspersão da água, acoplado a máquina classificadora de frutos, Porto Alegre, 2006.



FIGURA 25. Detalhe da barra com os bicos de aspersão de água do tipo leque (Marca Jacto, mod. 110-SF-015), Porto Alegre, RS, 2006.

Após a aplicação dos tratamentos, os frutos foram armazenados em sala com temperatura variando de 22,5°C por 15 dias. O experimento consistiu de seis tratamentos em delineamento experimental completamente casualizado com 3 repetições de 30 frutos por repetição nos frutos inoculados com *B. dothidea* e 3 repetições de 15 frutos por repetição nos frutos inoculados com *P. expansum*. Para ambos os fungos os tratamentos foram:

- T1-sem fermento não inoculado não tratado (controle);
- T2-sem fermento não inoculado tratado;
- T3-com fermento não tratado;
- T4-com fermento tratado;
- T5-com fermento inoculado não tratado;
- T6-com fermento inoculado tratado

As variáveis analisadas foram: severidade e incidência de podridões ocasionadas por *B. dothidea* e *Penicillium expansum*, número de podridões por

fruto, número de frutos com podridão, diâmetro das podridões (mm), medidas com paquímetro digital marca Digimess, modelo 100.174BL, sólidos solúveis, acidez total titulável e firmeza de polpa. Em paralelo foram conduzidos experimentos visando estudar a expressão gênica induzida pelo tratamento térmico e pela interação maçã-*B. dothidea*. Nesta parte do trabalho foram comparados apenas 4 tratamentos sendo eles: T1-sem fermento não inoculado não tratado (controle), T2-sem fermento não inoculado tratado, T3-com fermento inoculado tratado e T4-com fermento inoculado não tratado, através da metodologia descrita abaixo.

4.2.5. Isolamento de RNA

O RNA total foi extraído a partir de 400mg de tecido dos frutos de acordo com o método Concert™ Plant RNA Reagent Invitrogen®. Foram feitas 4 repetições de extração para cada tratamento. Após o isolamento do RNA foi tratado com 2 U por de ul de RNA RNaseOUT™ (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante.

A qualidade do RNA foi determinada através das razões A_{260}/A_{280} . A concentração de RNA foi calculada através da fórmula: $\{\text{RNA}\} = 40\mu\text{g.mL}^{-1} \times D^* \times A_{260}$ (Brasileiro et al., 1998).

Os mRNAs dos diferentes tratamentos foram obtidos utilizando o RNA total extraído e o sistema "PolyAtract® mRNA Isolation System III" (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Para testar a qualidade do RNA foi amplificando-o com oligonucleotídeos iniciadores baseados no gene de actina de maçã: actina – sentido (5'-CTACAAAGTCATCGTCCAGACAT-3') e actina – anti-senso (5'-

TGGGATGACATGGAGAAGATT-3'). (As condições de amplificação são as mesmas descritas abaixo para o DD-RT-PCR.

4.2.6. Differential Display RT-PCR

Para a síntese do cDNA, os mRNAs foram submetidos à reação da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O mRNA dos frutos foi transcrito reversamente (RT) adicionando 0,4 μ M dos oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 15), de 0,5 mM de cada dNTP [(dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen)]; 50 mM de Tris HCl (pH 8,3); 75 mM de KCl; 1 mM de DTT (ditiotretitol); 200 U da enzima transcrição reversa (MMLV-RT) (Amersham Biosciences) e água ultra pura até completar o volume de 5 μ L. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) por 1 hora a temperatura de 37°C.

A reação de PCR de amplificação foi composta de 5 μ L do cDNA; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM de KCl; 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; [(dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen)], 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo ancora e 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo arbitrário (Tabela 15); 3 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 50 μ L. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 17 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 90 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos, num total de 39 ciclos. Para a comprovação da eficiência da amplificação os produtos da reação de PCR

foram separados através de eletroforese em gel de agarose (Gibco/BRL) a 1,5% - contendo tampão TBE [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H₃BO₃ e 2 mM de EDTA]. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹), fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120). O marcador de massa molecular utilizado foi o de 1Kb DNA (Invitrogen).

TABELA 15. Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores baseados no trabalho de Sanches-Torres & Gonzalez-Candelas, (2003). LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

Oligonucleotídeos Iniciadores	Seqüência 5'—3'
Ancoras	
AP31-	TTC GGA TCC CCA TTT TTT TTT TTA
AP32	TTC GGA TCC CCA TTT TTT TTT TTC
AP33-	TTC GGA TCC CCA TTT TTT TTT TTG
Arbitrários	
AP51	TCT GAA TTC CCT CAA CGA GG
AP52	TCT GAA TTC CCT CAT TGG TC
AP53	TCT GAA TTC CCT CAC CAA TC
AP54	TCT GAA TTC CCT CAT ACA GG
AP55	TCT GAA TTC CCT CGT CAT AG

4.2.7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% (0,8% de acrilamida, 19,46 MM de N,N-metabisalacrilamida, 7 M de uréia, 90 mM de ácido bórico, 2mM de EDTA, 4,4 mM de persulfato de amônio e 3,9 mM de N,N,N,N- tetrametiletilenodiamino (TEMED). A eletroforese do gel foi realizada no sistema de seqüenciamento Hoefer™ SQ3 (Pharmacia Biosciences). As condições da eletroforese foram de 50 Watts por aproximadamente 5 horas a 45-50°C. As amostras foram incubadas a 95°C por 3 minutos antes da aplicação no gel de eletroforese.

Para os sistemas de coloração e revelação foram utilizados nitrato de prata e carbonato de sódio anidro, respectivamente, conforme método Silver Sequence™. A placa contendo gel foi imersa em ácido acético 10% e incubada por 20 minutos. Seguiram-se três lavagens com água destilada por 2 minutos e o gel foi imerso em solução de coloração (6 mM de AgNO₃ e 0,055% de formaldeído) durante 30 minutos, sob agitação constante, em temperatura ambiente. Após a lavagem durante 21 segundos com água destilada a coloração foi revelada com a imersão da placa em solução resfriada (10°C) de carbonato de sódio anidro (0,28 M de Na₂CO₃, 0,055% de formaldeído e 1,2 µM de tiosulfato de sódio), sob agitação constante. A reação foi interrompida através da adição de ácido acético glacial 10%. O gel foi fotografado através do sistema de foto-documentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120). Isolamento de cDNAs.

Os fragmentos de interesse foram isolados do gel através do método proposto por Song et al., (1995). Cada fragmento coletado foi eluído em 10 µL de água ultra-pura e em seguida submetido a temperatura de 90°C por 30 minutos em banho-maria.

Os fragmentos coletados e eluídos foram submetidos a uma re-amplificação pela PCR utilizando os mesmos iniciadores e as mesmas condições da amplificação. Os produtos da re-amplificação foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose 2% (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120).

Após a reação de re-amplificação as amostras foram quantificadas através de espectrofotômetro e então submetidas à purificação com as

enzimas ExoSAP-IT® (usb®), pela incubação a 37°C por 15 minutos, seguido de 80°C por 15 minutos, conforme orientações do fornecedor.

4.2.8. Seqüenciamento

Os fragmentos foram seqüenciados no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUC/RS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), através do sistema “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis Systems” no seqüenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences), utilizando 100 ng do produto de PCR e 0,25 µM do oligonucleotídeo iniciador E-0 e seguindo as instruções do fornecedor.

4.2.9. Análise de similaridade de seqüências

As seqüências obtidas do seqüenciamento foram analisadas através do programa Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências de nucleotídeos (BLASTn) (Basic Local Alignment Search Tool), disponíveis no banco de dados americano do National Center for Biotechnology Information – NCBI- (GenBank) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Efeito do tratamento térmico sobre a incidência e severidade da podridão branca e do mofo azul

A incidência e a severidade da doença foram menores nos frutos tratados com calor, após 15 dias de armazenamento a temperatura de 20°C a 25°C, independente do fungo utilizado na inoculação artificial. Quanto à incidência de podridões nos frutos inoculados, o tratamento térmico inibiu o desenvolvimento do fungo *B. dothidea*, mas não do fungo *P. expansum*, como pode ser observado na tabela 16. Em cada tratamento, 45 frutos foram inoculados com *P. expansum* e, em média 77,77% dos frutos apresentaram os sintomas do mofo azul, tanto nos frutos tratados como nos não tratados, ou seja, o tratamento térmico não inibiu o desenvolvimento da podridão nos frutos inoculados artificialmente (Tabela 16).

TABELA 16. Incidência de podridões em maçãs cv. Fuji, inoculados com os fungos *P. expansum* e ou *B. dothidea*, após 15 dias a 22,5°C, submetidas ao tratamento térmico por aspersão a 58°C, por 30 segundos. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/ UFRGS, Porto Alegre, 2006.

Tratamento	Porcentagem de frutos infectados	
	<i>B. dothidea</i>	<i>P. expansum</i>
T1-Não inoculado não tratado	0,0 cA ¹	0,0 cA
T2-não inoculado tratado;	0,0 cA	0,0 cA
T3-com ferimento não tratado	0,0 cA	0,0 cA
T4-com ferimento tratado	0,0 cA	0,0 cA
T5-inoculado não tratado	79,97 aA	77,77 aA
T6-inoculado tratado	38,88 bB	77,77 aA

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula (coluna) e maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer (5%).

O fungo *P. expansum* é conhecido por sua agressividade e no momento da aplicação do tratamento térmico (48 horas após a inoculação) o fungo já

havia infectado os tecidos dos frutos e iniciado o processo de podridão. Segundo Karabulut et al. (2002), análises de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que a germinação de esporos de *P. expansum* ocorre de 15 a 24 horas após a inoculação dos ferimentos. Este seria o período ideal de aplicação do calor, pois os esporos em germinação são mais sensíveis ao calor do que os esporos dormentes e do que o fungo já estabelecido. Estudos desenvolvidos por Barkai-Golan & Phillips, (1991) e D'Hallewin et al. (1994), demonstraram que o tratamento térmico foi ineficaz no controle de *P. expansum* logo após a sua inoculação, isso porque esporos dormentes são mais resistentes do que esporos que já iniciaram seu processo de germinação. Podridões causadas por *P. expansum* em maçã são de difícil controle através de métodos biológicos ou alternativos, devido à alta competitividade e agressividade do patógeno no local do ferimento (Spotts et al., 1999; Janisiewicz & Korsten, 2002). *P. expansum* é relativamente resistente a temperaturas elevadas. Segundo Karabulut et al. (2002), o crescimento do micélio de *P. expansum* só foi inibido a 60°C por 20 segundos, enquanto o crescimento do micélio de *Monilinia fructicola* foi completamente inibido pela exposição a 50°C durante 10 segundos. Estes resultados indicam que *P. expansum* tem um grau de resistência maior ao tratamento com calor do que outros patógenos.

Fallik et al., (1995) concluíram que o tempo para reduzir a 50% da germinação de esporos é 45% menor do que para reduzir o crescimento micelial a temperatura de 46°C. Temperaturas de tratamentos de 50–53°C são ineficazes para inativar esporos dormentes, mas podem diminuir a germinação,

crescimento e esporulação dos conídios (Dettori et al., 1996; D'hallewin et al., 1994). Estudos de D'hallewin et al. (1994) em pomelos inoculados com *P. digitatum* demonstraram que o tratamento térmico a 50°C por 2 minutos foi efetivo contra o desenvolvimento do patógeno mesmo sendo realizado 36 horas após a inoculação. O micélio foi visivelmente danificado e a infecção contida. Resultados similares foram obtidos em pomelos 'Star Ruby' inoculados com *P. italicum* (Dettori et al., 1996) e em limões tratados com água aquecida a 52°C por 2 minutos (Ben-Yehoshua et al., 1995).

Quanto aos frutos inoculados com *B. dothidea*, a incidência da podridão branca foi reduzida pelo tratamento térmico. Este fungo necessita de um período maior para infectar os tecidos dos frutos. Estudos desenvolvidos por Li et al. (2006) demonstraram que a germinação de conídios e a formação do apressório ocorrem em dois dias. O micélio cresce lentamente na superfície das lenticelas e 10 dias após a inoculação ocorre o aparecimento dos sintomas. Segundo Oster, (2004), ocorre inibição no crescimento do micélio e na germinação dos conídios de *B. dothidea* quando estes foram tratados com calor a 58°C.

O tratamento térmico reduziu o número de lesões por fruto ocasionadas por *B. dothidea* quando comparados os tratamentos 5 (não tratado) e 6 (tratado). O número de lesões foi superior nos frutos não tratados. Para os frutos inoculados com *P. expansum* a redução também ocorreu, mas de maneira menos intensa (Tabela 17).

TABELA 17. Número médio de lesões por maçã da cv. Fuji, após 15 dias a 22,5°C, submetidas ao tratamento térmico por aspersão a 58°C por 30 segundos. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/ UFRGS, Porto Alegre, 2006.

Tratamento	<i>B. dothidea</i>	<i>P. expansum</i>
T1-Controle	0,0 c ¹	0,0 c
T2-Não inoculado tratado;	0,0 c	0,0 c
T3-Com fermento não tratado	0,0 c	0,0 c
T4-Com fermento tratado	0,0 c	0,0 c
T5-Inoculado não tratado	3,2 a	1,5 a
T6-Inoculado tratado	0,50 b	1,2 a

¹Médias seguidas de mesma não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer (5%).

Quanto ao tamanho médio das lesões, estas foram menores nos frutos tratados com calor, independente do fungo utilizado na inoculação (Tabela 18). Os frutos inoculados com o fungo *B. dothidea* apresentaram lesões maiores do que as causadas por *P. expansum*, nos frutos não tratados. O tratamento com calor não teve influência sobre o tamanho das lesões ocasionadas por *P. expansum* (Tabela 18). Após o fungo iniciar o processo de infecção, o tratamento a 58°C por 30 segundos não é suficiente para eliminar por completo o fungo. Este fato é importante, pois um fruto com podridão, por menor que esta seja, é descartado na hora da seleção para comercialização e consumo.

TABELA 18. Diâmetro médio das lesões em maçãs da cv. Fuji, após 15 dias a 22,5°C, submetidas ao tratamento térmico por aspersão a 58°C por 30 segundos. Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/UFRGS, Porto Alegre, 2006.

Tratamento	Diâmetro médio das lesões em mm	
	<i>B. dothidea</i>	<i>P. expansum</i>
T1-Não inoculado não tratado	0,0 cA ¹	0,0 cA
T2-Não inoculado tratado;	0,0 cA	0,0 cA
T3-Com fermento não tratado	0,0 cA	0,0 cA
T4-com fermento tratado	0,0 cA	0,0 cA
T5-Inoculado não tratado	17,9 aA	13,4 aB
T6-Inoculado tratado	11,9 bB	11,8 aB

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula (coluna) e maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer (5%).

O tratamento térmico foi mais eficiente na diminuição da incidência e severidade de *B. dothidea*, assim a sua utilização comercial no controle desta doença poderá ter mais êxito do que no controle de *P. expansum* (Tabela 16).

4.3.2. Efeito do tratamento térmico sobre as características físico químicas dos frutos

No momento da instalação do experimento os frutos apresentavam firmeza de polpa de 75,6 Newtons, sólidos solúveis totais de 16,5 Brix e acidez total titulável de 7,0 (Meq de ácido málico/ 100ml de suco). Nesta condição de maturação os frutos utilizados neste experimento encontravam-se em um estágio de maturação ideal para o armazenamento prolongado, pois apresentavam elevada firmeza de polpa e acidez titulável. A escolha deste ponto de maturação para a colheita dos frutos e instalação do experimento deve-se ao fato de que, segundo Oster (2004) o tratamento com calor tem maior efeito sobre a incidência de podridão branca em maçãs 'Fuji' quando os frutos apresentam estágio menos avançado de maturação.

A aplicação do tratamento térmico a 58°C por 30 segundos não causou danos aparentes na epiderme dos frutos. Segundo Kays (1991), as temperaturas altas provocam estresse nos tecidos dos frutos, causando efeitos diretos como danos nas membranas ou desnaturação dos ácidos nucléicos e proteínas. Normalmente, o dano mais comum observado nos frutos tratados com calor é o escurecimento da epiderme (Phillips & Austin, 1982; Anthony et al., 1989; Jacobi & Wong, 1991; Schirra et al., 1999), tornando-os inaceitáveis comercialmente. Não foram observados sintomas de escurecimento nos frutos tratados com calor.

TABELA 19. Características físico-químicas de maçã cv. Fuji, inoculados e não inoculados com *B. dothidea*, submetidas ao tratamento térmico por aspersão a 58°C por 30 segundos, após 15 dias a 22,5°C, Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/ UFRGS, Porto Alegre, 2006.

Tratamento	FP (Newtons)	ATT (Meq de ácido málico/100ml de suco)	SST (°Brix)
T1-Não inoculado não tratado	71,5 b ¹	7,9 c	13,5 ab
T2-Não inoculado tratado	77,5 a	7,9 c	12,1 bc
T3-Com fermento não tratado	66,0 bc	9,2 ab	11,6 bc
T4-com fermento tratado	65,8 bc	9,5 a	11,2 c
T5-Inoculado não tratado	67,6 b	8,5 bc	12,5 bc
T6-Inoculado tratado	64,8 c	8,3 bc	15,5 a

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer (5%).

As demais características de qualidade também foram pouco afetadas pelo tratamento com calor. A firmeza de polpa de maçãs da cv. Fuji submetidos ao tratamento térmico, avaliados após quinze dias de armazenamento a temperatura de 22,5°C foi superior nos frutos tratados e não inoculados diferindo dos demais tratamentos. A menor firmeza encontrada neste experimento foi nas maçãs inoculadas com *B. dothidea* e tratadas com calor (Tabela19).

TABELA 20. Características físico-químicas de frutos de maçã cv. Fuji inoculados e não inoculados com *P. expansum* submetidas ao tratamento térmico por aspersão a 58°C por 30 segundos, após 15 dias a 22,5°C, Laboratório de Fisiologia Pós-colheita/ UFRGS. Porto Alegre, 2006.

Tratamento	FP (Newtons)	ATT (Meq de ácido málico/100ml de suco)	SST (°Brix)
T1-Não inoculado não tratado	73,5 a ¹	6,5 bc	13,2 ab
T2-Não inoculado tratado;	63,4 bc	8,2 a	11,5 b
T3-Com fermento não tratado	66,2 b	6,9 b	14,3 a
T4 com fermento tratado	67,5 b	6,5 bc	14,2 a
T5 Inoculado não tratado	63,7 bc	6,3 c	14,1 a
T6 Inoculado tratado	60,4 c	6,1 c	13,7 ab

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste DMS de Fischer (5%).

Quando comparadas as firmezas na inoculação dos dois fungos observa-se que o efeito do *P. expansum* é mais pronunciado, podendo-se considerar este como mais agressivo a firmeza das frutas. Nos frutos inoculados com *P.*

expansum a firmeza de polpa foi superior nos frutos controle diferindo dos demais tratamentos. Os menores valores de firmeza de polpa também foram encontrados nas maçãs inoculadas e tratadas com calor.

O fato da firmeza de polpa ser menor em ambos experimentos nos frutos inoculados e tratados com calor, pode ter ocorrido em resposta aos dois tipos de estresse sofridos pelos frutos, o do tratamento com calor e o da própria ação do fungo. Segundo Klein e Lurie. (1990), Conway et al. (1994), Lurie et al. (1998) e Lunardi (2001) os frutos submetidos ao tratamento térmico apresentaram maiores valores de firmeza de polpa do que os tratamentos que não receberam calor. A diminuição dos níveis de firmeza pode ocorrer devido a indução da síntese de enzimas hidrolíticas da parede celular como as poligalacturonases (Chan et al., 1989; Yoshida et al., 1984; Lazan et al., 1989) e α - e β -galactosidase (Sozzi et al., 1996). Em maçãs, ocorre um aumento considerável nos níveis de poligalacturonases e pectina-metilesterases nos frutos infectados por *P.expansum*. Segundo Miedes & Lorences, (2006) a atividade dessas enzimas hidrolíticas aumenta durante a infecção por fungos A despolimerização das pectinas pode aumentar a porosidade da parede celular e facilitar o a colonização pelo fungo e o processo da infecção.

Em tomate, os mRNAs para poligalacturonases não foram encontrados nos frutos durante os três dias de tratamento térmico a 38°C, mas retornaram aos níveis iniciais após a suspensão do tratamento térmico (Lurie et al., 1996). Os teores de ácidos orgânicos, não diferiram entre os tratamentos. O tratamento térmico pode contribuir para a redução dos teores de acidez titulável (Klein et al., 1990; Lurie et al., 1998). No caso da cultivar Fuji, isto é uma desvantagem,

pois diminuindo excessivamente a acidez dos frutos o sabor fica alterado, em função do elevado teor de sólidos solúveis totais o que não é necessariamente um benefício para cultivares menos ácidas, como no caso da cultivar Fuji. Para esta cultivar, a manutenção da acidez é muito importante, uma vez que propicia melhor sabor. Os menores teores de acidez titulável devem ser atribuídos a incrementos na atividade metabólica em decorrência dos tratamentos. Segundo Hardenburg et al. (1986), ocorre um maior consumo de ácidos e hexoses, como substrato para a respiração, em tecidos submetidos a condições de estresse.

As diferenças nos teores de sólidos solúveis totais foram pouco pronunciadas. Mesmo não havendo diferenças significativas os SST dos frutos inoculados com *P. expansum* apresentaram valores mais elevados quando submetidos ao tratamento térmico. Autores como Klein & Lurie, (1990) também constataram que tratamentos de calor não alteram os teores de SST, mesmo após seis meses de armazenagem a 0°C. Um dos motivos pode ser relativo ao próprio método refratométrico, que não tem sensibilidade para detectar diferenças pequenas de teores de sólidos solúveis. Outra possibilidade a considerar é o comportamento desta variável em pós-colheita. Há uma variação considerável ao longo de períodos de amostragem que não permite conclusões sobre efeitos no metabolismo baseado nas variações de SST, conforme já foi observado por Bender & Lunardi, (2001) com maçãs da cv. Gala.

4.3.3. Resultados da Expressão Gênica Diferencial

O bom funcionamento da técnica de DD-RT-PCR é fortemente dependente da qualidade e da quantidade do RNA utilizado inicialmente. Deste modo, a qualidade e quantidade do RNA extraído de frutos de maçã foram verificadas por leitura em espectrofotômetro (Tabela 21) e por visualização em gel de agarose (Figura 24). Além disso, o mRNA foi purificado a partir do RNA total e testado pela amplificação de um gene constitutivo, a actina (Figura 25).

TABELA 21. Características do RNA total de maçãs, cv. Fuji, obtidos através do Protocolo de Extração Concert™ Plant RNA Reagent Invitrogen®, LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

Tratamento	260/280 ¹	µg/µL ²
T1 – Não inoculado não tratado	1,7	0,245
T2 – Não inoculado tratado	1,9	0,434
T3 – Inoculado não tratado	2,0	0,380
T4 – Inoculado tratado	2,0	0,492

¹ Razão A_{260}/A_{280}

² {RNA} = $40\mu\text{g.mL}^{-1} \times D^* \times A_{260}$

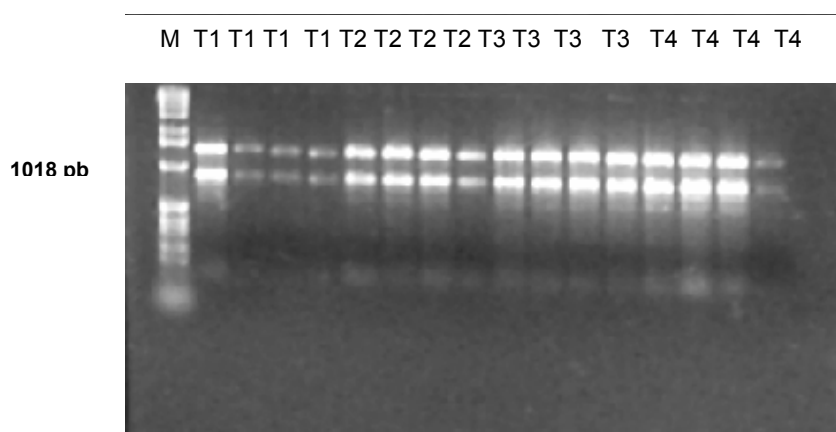


FIGURA 26. Perfil eletroforético do RNA total extraído de frutos de maçã cv. Fuji M - Marcador de 1Kb DNA. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2006.

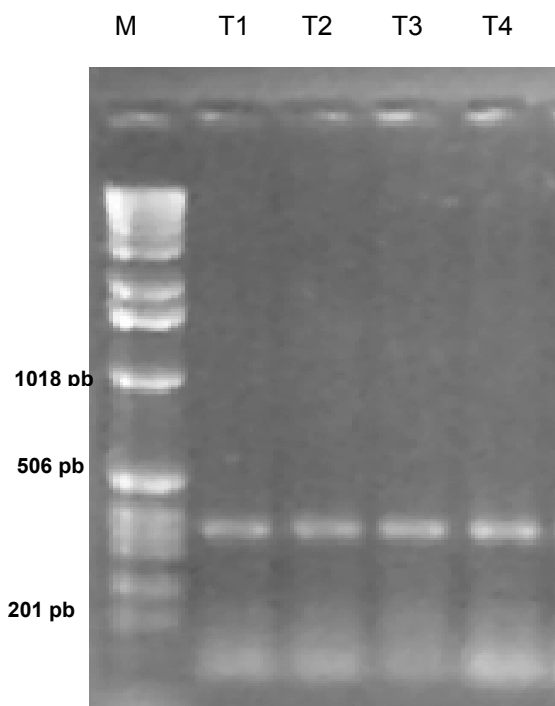


FIGURA 27. Perfil eletroforético da amplificação do mRNA com oligonucleotídeos de actina. M- Marcador de 1Kb. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2006.

Foram testadas quinze combinações de oligonucleotídeos iniciadores, as quais permitiram identificar 200 fragmentos de cDNAs nos géis de poliacrilamida. Os fragmentos isolados correspondem a genes diferencialmente expressos quando comparados os quatro diferentes tratamentos. Estes fragmentos foram coletados, eluídos, re-amplificados e visualizados em gel de agarose a 2%. O tamanho dos fragmentos re-amplificados ficou entre 500 e 300 pares de bases. Dos 200 fragmentos coletados, 96 foram re-amplificados (Figura 26), purificados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI (GenBank) (www.ncbi.nlm.nih.gov) através dos programas BLASTn (Basic Local Alignment Search Toll).

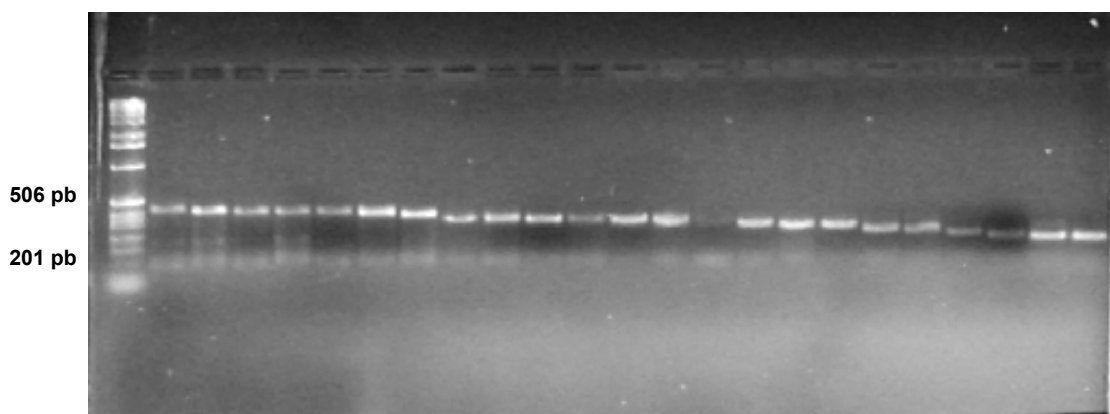


FIGURA 28. Produtos de re-amplificação por PCR, separados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Marcador 1Kb, LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2006.

Após a comparação das seqüências através do programa BlastN, não foi possível a obtenção de similaridade com as seqüências depositadas no banco de dados utilizado. De acordo com a literatura, a técnica de DD-RT-PCR é bastante sensível, podendo gerar uma grande quantidade de artefatos. Pequenas contaminações podem alterar o padrão das bandas. Estudando a interação entre tomate e *Botrytis cinerea*, Benito et al. (1996) isolaram fragmentos cujo seqüenciamento indicou que eram de origem humana. A extrema sensibilidade pode gerar até 30% de falsos positivos (Malhotra et al., 1998). Outros aspectos negativos da técnica de DD-RT-PCR a identificação de genes redundantes e a baixa repetibilidade da técnica.

5. CONCLUSÕES

- Maçãs verdes da cv. Fuji apresentam maior quantidade de RNA que maçãs próximas a senescência ou colhidas no ponto de maturação ideal, bem como os tecidos da epiderme apresentam maior quantidade de RNA do que os tecidos polpa e epiderme+polpa;
- A melhor qualidade e a maior quantidade de RNA de frutos de maçã foram obtidos através do método de extração Concert;
- A técnica de DD-RT-PCR possibilitou a análise da expressão dos genes regulados durante a interação maçã-*Botryosphaeria dothidea*;
- Os fragmentos isolados demonstraram similaridade com genes provenientes de plantas, três deles similares a genes de *M. domestica*;
- Das quatro proteínas diferencialmente expressas, três estão relacionadas com funções de respostas de defesa e estresse e foram isoladas nos frutos inoculados, porém são necessários estudos mais aprofundados para determinar o envolvimento dessas proteínas nas respostas de defesa de maçãs à *B. dothidea*.
- Maçãs 'Fuji' tratadas com aspersão de água quente até 58°C por 30 segundos não apresentam alterações significativas nas características físico-químicas após 15 dias de armazenamento em temperatura de 22,5°C;

- A aplicação do tratamento com calor com temperatura de 58°C por 30 segundos, reduz os sintomas de podridão branca e do mofo azul, em maçãs 'Fuji', porém, estes tratamentos não são suficientes para controlar com eficácia a doença.
- Apesar do grande número de fragmentos diferencialmente expressos obtidos com a técnica de DD-RT-PCR, não foi possível a obtenção de similaridade com genes presentes no banco de dados utilizado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D.L. Quality measurement of fruits & vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 15, p. 207-225, 1999.

AGAR, T.; GARCIA, J.M.; MIEDTKE, V. et al. Effect of high CO₂ and low O₂ concentrations on the growth of *Botrytis cinerea* at different temperatures. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v.55, p.219-222, 1990.

AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; JWA, N.S. Rice (*Oryza sativa* L) OsPR1b gene is phytohormonally regulated in close interaction with lights signals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.278, p.290-298, 2000.

AMIRI A.; BOMPEIX, G. Population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments. **Plant Pathology**, Oxford, v.54, p.74–81, 2005.

ANTHONY, B.R.; PHILLIPS, D.J.; BADR, S. et al. Decay control and quality maintenance after moist air heat treatment of individually plastic-wrapped nectarines. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.114, p.946-949, 1989.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Report**, Atenas, v.9, p.208-218, 1991.

ASIF, M.; PRABODH, T.; THEOPHANES, S.; TUCKER, M. isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.54, p.5227-5229, 2006.

ASIF, M.H.; DHAWAN, P.; NATH, P. A simple procedure for isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, Otawa, v.18, p.109-115, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ – ABPM. **Informações estatísticas da maçã**. Disponível em: www.abpm.org.br/portugues/maca/estatisticas/informacoesestatisticas.html
Acesso em: 20 de jun. 2006.

ASTURIAS, J. A.; ARILLA, M. C.; GOMEZ-BAYON, N. et al. Cloning and immunological characterization of the allergen Hel a 2 (profilin) from sunflower pollen. **Molecular Immunology**, Elmsford, v.35, p.469-478, 1998.

AWAD, M.A.; DE JAGER, A. Influences of air and controlled atmosphere storage on the concentration of potentially healthful phenolics in apples & other fruits. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.27, p.53-58, 2003.

AYGAN, A. Nucleic acid extraction from clinical specimens for PCR applications. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v.30, p.107-120, 2006.

BALDI, P.; PATOCCHI, A.; ZINI, E. et al. Cloning and linkage mapping of resistance gene homologues in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.109, p.231-239, 2004.

BALDWIN, E. Fruit flavor, volatile metabolism and consumer perceptions. In: Knee, M., **Fruit Quality and its Biological Basis**. Columbus: CRC Press, 2002. 279p. p.89-106.

BALUSKA, F.; BUSTI, E.; DOLFINI, S. et al. Lilliputian mutant of maize shows defects in organization of actin cytoskeleton. **Development Biology**, New York, v.236, p.478-491, 2001.

BARKAI-GOLAN, R.; PHILIPS, D.J. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. **Plant Disease**, Saint Paul, v.75, p.1085-1089, 1991.

BECKER, W. F.; IEKI, H. Ocorrência e patogenicidade de *Botryosphaeria dothidea* como agente causal da seca de ramos em pereira japonesa no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.28, p.201-203, 2002.

BELFANTI, E. et al. The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, p.886-890, 2004.

BENAOUF, G.; PARISI, L. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, p.236-242, 2000.

BENDER, R.J.; LUNARDI, R. Perdas qualitativas de maçãs cv. Gala em armazenamento refrigerado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, p.563-567, 2001.

BENDER, R.J.; OSTER, A.H. Bioquímica Aplicada às fruteiras de clima temperado. In: ENCONTRO NACIONAL DE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 4, 2001, Fraiburgo. **Anais...** Caçador: Epagri, 2001. v.1, p.170-175.

BENITO, E.P.; PRINS, T.; VAN KAN, J.A.L. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant–fungus interaction. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.32, p.937–947, 1996.

BEN-YEHOSHUA, S.; RODOV, V.; FANG, D.Q., et al. Preformed antifungal compounds of citrus fruit: effect of postharvest treatments with heat and growth regulators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, p. 1062-1066, 1995.

BERTON, O.; BLEICHER, J.; BONETI, T.J. da S.; KATSURAYAMA, Y. Doenças fúngicas dos ramos: podridão-branca – *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. (= *B. ribis* Gross. & Dug.) (= *B. berengeriana* De Not.), (*Dothiorella* sp. Sacc). IN: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: Epagri, 2002. p.567-571.

BERTON, O.; SANTOS, J. P.; DENARDI, F. Relação entre danos de mosca-das-frutas e a incidência de podridão amarga em frutos de macieira. In: ENCONTRO NACIONAL DE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 8, 2005, Fraiburgo. **Anais...** Caçador: Epagri, 2005. v.2. p.73-73.

BEUNING, L.; BOWEN, J. PERSSON, H. et al. Characterization of Mal d 1-related genes in *Malus*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.55, p.369-388, 2004.

BIALE, J.B. Synthetic and degradative processes in fruit ripening. In: HAARD, N.; SALUNKHE, D. K. **Postharvest biology and handling of fruits and vegetables**. Westport, Connecticut: AVI Publishing, 1975. p. 5-18.

BLEICHER, J.; BERNARDI, J. **Podridões de maçã e seu controle na pós-colheita**. Florianópolis: EMPASC, 1985. 24p. (Boletim técnico, 28).

BONETI, J.I.S.; KATSURAYAMA, Y. Doenças da macieira (*Malus domestica* Bork.). In: BONETI, J. I. S.; RIBEIRO, L. G.; KATSURAYAMA, Y. **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 1999. p.13-95.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. de C. (Eds.) **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. 309p.

BRAUN, M.; BALUSKA, F.; VON WITSCH, M. et al. Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. **Planta**, Berlin, v.209, p.435-443, 1999.

BRENZ VERCA, M.S.; BRENZ VERCA, S.; RUSCONI, S. et al. Modification of primer design facilitates the use of differential display. **Biotechniques**, Natick, v.24, p.374–380, 1998.

BROWN I.; E.A.; BRITTON, K.O. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the Southern United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v.70, p.480-484, 1986.

BROWN, A.E.I. Relationship of endopolygalacturonase inhibitor activity to the rate of fungal rot development in apple fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v.111, p.122-132, 1984.

BROWN, E.A.I.; BRITTON, K.O. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the Southern United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v.70, p.480-484, 1986.

BROWN, E.A.I.; HENDRIX, F.F. Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on apple stems. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, p.375-379, 1981.

BRUTON, B.D. Mechanical injury and latent infections leading to postharvest decay. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.7, p. 747-749, 1994.

BUCHANAN-WOLLASTON, V. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.105, p.839-846, 1994.

BUCHANAN-WOLLASTON, V.; AINSWORTH, C. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.33, p.821-834, 1997.

BUGOS, R.C.; CHIANG, V.I.; ZHANG, X.H. et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **BioTechniques**, Natick, v.19, p. 734-737, 1995.

BURCHILL, R.T. Hot water as a possible postharvest control of *Gloeosporium* rots of stored apples. **Plant Pathology**, Oxford, v.13, p.106-107, 1964.

BUTT, A. et al. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in Arabidopsis in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringiae*. **Plant Journal**, Oxford, v.16, p.209-221, 1998.

CALENGE, F.; VAN DER LINDEN, C. G.; VAN DE WEG, E. et al. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.110, 2005.

CALLARD, D.; LESCURE, B.; MAZZOLINI, L. A method for the elimination of false positives generated by the mRNA Differential Display Technique. **Biotechniques**, Natick, v.16, p.1096-1103, 1994.

CAMILO, A. P.; DENARDI, F. Cultivares: Descrição e comportamento no Sul do Brasil. In: EPAGRI. **A cultura da Macieira**. Florianópolis-SC, 2002. p.113-168.

CANNON, S.B.; ZHU, H.; BAUMGARTEN A. M. et al. Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS-LRR

resistance gene subfamilies. **Journal of Molecular Evolution**, Nova York, v.54, p.548-62, 2002.

CARRERA, E.; PRAT, S. Expression of the Arabidopsis *abi1-1* mutant allele inhibits proteinase inhibitor wound-induction in tomato. **Plant Journal**, Oxford, v.15, p.765-71, 1998.

CHAN, H.T.; LINSE, E. Conditioning cucumbers for quarantine heat treatments. **HortScience**, Alexandria, v.24, p.985-989, 1989.

CHATTHAI, M.; KAUKINEN, K.H.; TRANBARGER, T.J. et al. The isolation of a novel metallothionein related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas fir: regulation by ABA, osmotic, and metal. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.34, p.243-54, 1997.

CHEN, H. J.; HOU, W. C.; YANG, C. Y. Et al. Molecular cloning of two metallothionein-like protein genes with differential expression patterns from sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.160, p.547-55, 2003.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manejo**. 2.ed. Lavras: Ufla, 2005. 785p.

CHOI, D.; KIM, H.M.; YUN, H.K. et al. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.112, p.353-359, 1996.

CONWAY, W.S.; JANISIEWICZ, W.J.; KLEIN, J.D. et al. Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. **HortScience**, Alexandria, v.34, p.700-704, 1999.

CONWAY, W.S.; SAMS, C.E.; WANG, C.Y.; ABBOTT, J. A. Additive effects of postharvest calcium and heat treatment on reducing decay and maintaining quality in apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.119, p.49-53, 1994.

COUEY, H.M. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. **HortScience**, Alexandria, v.24, p.198-202, 1989.

COUPE, S. A.; TAYLOR, J. E.; ROBERTS, J. A. Characterization of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted avscission of *Sambucus nigra* L. leaflets. **Planta**, Berlin, v.197, p.442-447, 1995.

DAL CIN, V.; DANESIN, M.; RIZZINI, F. M.; RAMINA, A. RNA Extraction From Plant Tissues. The Use of Calcium to Precipitate Contaminating Pectic Sugars **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.31, p.113-120, 2005.

DAVIES, C.; ROBINSON, S.P. Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.122, p.803–812, 2000.

DEGENHARDT, J. **Transcript analysis of apple scab susceptible and resistant *malus domestica* Borkh. cultivars and establishment of a mannose selection of transformation system for apple.** 135f. 2006. Tese (Doutorado - Ciências da Horticultura) - Fakultat de Gottfriedculdade de Agronomia, Universidade de Hannover, Hannover, Alemanha.

DEGENHARDT, J.; ABDUL, A.; KUERKCUEOGLU, S. et al. Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.273, p.326-335, 2005.

DENMAN, S.; CROUS, P.W.; TAYLOR, J.W. et al. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. In: Molecules, morphology and classification: Towards monophyletic genera in the Ascomycetes. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.45, p.129–140, 2000.

DETTORI, A.; D'HALLEWIN, G.; SCHIRRA, M. et al. Studies on *Penicillium italicum*- 'Star Ruby' grapefruit interactions as affected by fruit hot water dipping. **Proceedings of International Society of Citriculture**, Sun City, v.2, p.1158-1163, 1996.

D'HALLEWIN, G.; ARRAS, G.; CASTIA, T.; PIGA, A. Reducing decay of Avana mandarin fruit by the use of UV, heat and thiabendazole treatments. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.368, p.387–394, 1994.

DUNAEVA, M.; ADAMSKA, I. Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.268, p.5521-5529, 2001.

DUREL, C.E.; PARISI, L. LAURENS, F. et al. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. **Genome**, Ottawa, v.46, p.224–234, 2003.

DURRANT, W.E.; ROWLAND, O.; PIEDRAS, P. cDNA-AFLP Reveals a Striking Overlap in Race-Specific Resistance and Wound Response Gene Expression Profiles. **The Plant Cell**, Rockville, v.12, p.963–977, 2000.

ERKAN, M.; PEKMEZCI, M.; WANG, C.Y. Hot water and curing treatments reduce chilling injury and maintain post-harvest quality of 'Valencia' oranges. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 40, p. 91-96, 2005.

EVANS, K.M.; JAMES, C. M. Identification of SCAR markers linked to PI-w mildew resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.106, p.1178–1183, 2003.

FALLIK, E. Pre-storage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.32, p.125-134, 2004.

FALLIK, E.; AHARONI, Y.; COPEL, A. et al. A short hot water rinse reduces postharvest losses of 'Galia' melon. **Plant Pathology**, Saint Paul, v.49, p.333-338, 2000.

FALLIK, E.; GRINBERG, M.; GAMBOURG, J. et al. Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. **Plant Pathology**, Oxford, v.45, p.92-97, 1995.

FALLIK, E.; GRINBERG, S.; ALKALAI, S. et al. A unique rapid hot water treatment to improve storage quality of sweet pepper. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.15, p.25-32, 1999.

FALLIK, E.; ILIC, Z.; TUVIA-ALKALAI, S.; COPEL, A. et al. A short hot water rinsing and brushing reduces chilling injury and enhance resistance against *Botrytis cinerea* in fresh harvested tomato. **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v.16, p.3-6, 2002.

FALLIK, E.; TUVIA-ALKALAI, S.; FENG, X. et al. Ripening characterization and decay development of stored apples after a short pre-storage hot water rising and brushing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.

FAO. [Informações]. Disponível em: www.faostat.fao.org. Acesso em: nov. 2006.

FERGUSON, I.B.; BEN-YEHOSHUA, S.; MITCHAM, E.J. et al. Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 21, p.1-6, 2000.

FREEMAN, W.M.; ROBERTSON, D.J.; VRANA, K.E. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques**, Natick, v.29, p.1042-1055, 2000.

GAO, Z.S.; VAN DE WEG, W.E.; SCHAART, J.G. et al. Cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, p.171–183, 2005.

GASIC, K.; HERNANDEZ, A.; SCHUYLER, K.S.; Extraction From Different Apple Tissues rich in Polyphenols and Polysaccharides for cDNA Library Construction. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.22, p.1-7, 2004.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.52, p.725-749, 2001.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.205-27, 2005.

GOULAO, L. F.; OLIVEIRA, C. M. Molecular identification of novel differentially expressed mRNAs up-regulated during ripening of apples. **Plant Science**, Limerick, v.172, p.306–318, 2007.

GRAY, J.; PICTON, S.; SHABBEER, J. et al. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.19, p.69–87, 1992.

GREEN, P. J. The ribonucleases of higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.45, p.421-455, 1994.

GUANG-XU, L.; YONG-BO, S.; YAN-MIN, G. et al. U. Infection process of *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit. **Journal of Fruit Science**, Pequim, v.1, p. 20-30, 2006.

GUILLEN, G.; VALDES-LOPEZ, V.; NOGUEZ, R. et al. Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated in vivo by phosphorylation on tyrosine residues. **The Plant Journal**, Oxford, v.19, p.497-508, 1999.

HAMER, D. H. Metallothionein. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.55, p.913-51. 1986.

HARDENBURG, R.E.; WATADA, A.E.; WANG, C.Y. **The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks**. Washington: USDA, 1986. 130p. (USDA. Agriculture Handbook, 66)

HEMMAT, M.; BROWN, S.K.; WEEDEN, N.F. Tagging and mapping scab resistance genes from R12740-7A apple. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Kent, v.127, p.365–370, 2002.

HERMSMEIER, D.; HART, J.K.; BYZOVA, M. Et al. Changes in mRNA abundance within *Heterodera schachtii*-infected roots of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.13, p.309–315, 2000.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.122, p.155-66, 2004.

HOFMAN, P.J. Production factors influence fruit quality and response to postharvest treatments. In: COATES, L.M.; HOFMAN, P.J.; JOHNSON, G.I. (Eds.) **Disease control and storage life extension in fruit**. [S.l. : s.n.], 1998. p. 6-18.

HOLMBERG, N.; BÜLOW, L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. **Trends on Plant Science**, Oxford, v.3, p.61–66, 1998.

HOLZINGER, A.; LÜTZ-MEINDL, U. Kinesin-Like Proteins Are Involved In Postmitotic Nuclear Migration of The Unicellular Green Alga *Micrasterias denticulata*. **Cell Biology International**, Londres, v.26, p.689-697, 2002.

HSIEH, H.M.; LIU, W.K.; HUANG, P.C. A novel stress inducible metallothionein like gene from rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.28, p.381–389, 1995.

HUANG, S.; MCDOWELL, J.M.; WEISE, M.J. et al. The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.111, p.115-26, 1996.

HULME, A.C.; RHODES, M.J.C.; WOOLTORTON, L.S.C. The relationship between ethylene and the synthesis of RNA and protein in ripening apples. **Phytochemistry**, Nova York, v.10, p.749-756, 1971.

JACKSON, A.O.; LARKINS, B.A. Influence of ionic strength, pH, and chelation of divalent metals on isolation of polyribosomes from tobacco leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.57, p.5–10, 1976.

JACOBI, K.K.; WONG, L.S. The injuries and changes in ripening behavior caused to Kensington mango by hot water treatments. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.29, p.372–378, 1991.

JANISIEWICZ, J.W.; LEVERENTZ, B.; CONWAY, S.W. et al. 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**, Amsterdam, v.29, p.129-143, 2003.

JANISIEWICZ, W.J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p.411-441, 2002.

JARVIS, W. R. Latent infections in the pre- and post-harvest environment. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.7, p.749-751, 1994.

JONES, A.L.; ALDWINCKLE, H.S. **Compendium of apple and pear diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1990. 100p.

JONES, C.S.; DAVIES, H.V.; TAYLOR, M.A. Profiling of changes in gene expression during raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening by application of RNA fingerprinting techniques. **Planta**, Berlin, v.211, p.708–714, 2000.

JONES, D.A.; JONES, J.D.G. The roles of leucine-rich repeat proteins in plant defences. **Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology**, Oxford, v.24, p.89-167, 1997.

KADER, A.A. Increasing food availability by reducing postharvest losses of fresh produce. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.682, p.2169-2175, 2005.

KAPRANOV, P.; JENSEN, T.J.; POULSEN, C. et al. A protein phosphatase 2C gene, LjNPP2C1, from *Lotus japonicus* induced during root nodule development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.96, p.1738-1743, 1999.

KARABULUT, O. A.; COHEN, L.; WIESS, B. et al. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.24, p.103-111, 2002.

KAYS, S.J. **Postharvest Physiology of Perishable Plant Products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 532p. Cap. 3: Metabolic Processes in Harvested Products.

KE, D.; RODRIGUEZ-SINOBUS, L.; KADER, A.A. Physiology and prediction of fruit tolerance to low-oxygen atmospheres. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.116, p.253-260, 1991.

KIM, K.W.; PARK, E.W.; AHN, K. Pre-penetration behavior of *Botryosphaeria dothidea* on apple fruits. **Plant Pathology Journal**, Seoul, v.15, p.223-227, 1999.

KIM, K.W.; PARK, E.W.; KIM, Y.H. et al. Latency- and defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.91, p.165-172, 2001.

KLEBER-JANKE, T.; CRAMERI, R.; APPENZELLER, U. et al. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.119, p. 265-274, 1999.

KLEIN, J. D.; LURIE, S. Heat treatments for improved postharvest quality of horticultural crops. **HortTechnology**, Alexandria, v.2, p.316-320, 1992.

KLEIN, J. D.; LURIE, S. Prestorage heat treatments as a means of improving poststorage quality of apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, p.265-269, 1989.

KLEIN, J.D. Relationships of harvest date, storage conditions and fruit characteristics to bruise susceptibility of apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, p.113-118, 1987.

KLEIN, J.D. Relationships of harvest date, storage conditions and fruit characteristics to bruise susceptibility of apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, p.113-118, 1987.

KLEIN, J.D.; CONWAY, W.S.; WHITAKER, B. D. et al. *Botrytis cinerea* decay in apple is inhibited by postharvest heat and calcium treatments. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.122; p.91-94, 1997.

KLEIN, J.D.; LURIE, S. Prestorage heat treatment as a means of improving poststorage quality of apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, p. 265-269, 1990.

KLEIN, J.D.; LURIE, S.; BEN-ARIE, R. Quality and cell wall components of 'Anna' and 'Granny Smith' apples treated with heat, calcium, and ethylene. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, p.954-958, 1990.

KNEE, M. Pome fruits. In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A.; **Biochemistry of fruit ripening**. New York : Chapman and Hall, 1993. p.325-346.

KOHN, F.C.; HENDRIX, F.F. Temperature, free moisture, and inoculum concentration effects on the incidence and development of white rot of apple. **Phytopathology**, Saint Paul, v.72, p.313-316, 1982.

KRUGER, W. M.; PRITSCH, C.; CHAO, S. et al. Functional and comparative bioinformatic analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.15, p.445-55, 2002.

KUERKCUEOGLU, S.; DEGENHARDT, J.; LENSING, J. et al. Identification of differentially expressed genes in *Malus domestica* after application of the non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the phyllosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.58, p.733-741, 2007.

KUHN, E. From Library Screening to Microarray Technology: Strategies to Determine Gene Expression Profiles and to Identify Differentially Regulated Genes in Plants. **Annals of Botany**, Londres, v.87, p.139-155, 2001.

LAY-YEE, M.; DELLA-PENNA, D.; ROSS, G.S. Changes in mRNA and protein during ripening of apple fruit (*Malus domestica* Borkh. cv. Golden Delicious). **Plant Physiology**, Minneapolis, v.94, p.850-853, 1990.

LAZAN, H.; MOHD, Z.; KAM, A. et al. Polygalacturonase activity and variation in ripening of papaya fruit with tissue depth and heat treatment **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.77, p.93-98, 1989.

LEDGER, S. E.; GARDNER, R. C. Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.25, p.877-886, 1994.

LEE, J.; DONGHWAN, S.; WON-YONG, S.; INHWAN, H.; Arabidopsis metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.54, p.805-810, 2004.

LEE, S.Y.; SEO, J.S.; RODRIGUEZ-LANETTY, M. et al. Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.269, p.101-108, 2003.

LEE, Y.P.; YU, G.H.; SEO, Y.S. et al. Microarray analysis of apple gene expression engaged in early fruit development. **Plant Cell Reporter**. 2007. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/uj155408276p2l6q/fulltext.pdf>. Acesso em: fev. 2007.

LENNOX, C.L.; SPOTTS, R.A. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, p.645–649, 2003.

LEUBE, M.P.; GRILL, E.; AMRHEIN N. ABI1 of Arabidopsis is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration. **FEMS Letters**, Amsterdam, v.424, p.100-104, 1998.

LEVERENTZ, B.; JANISIEWICZ, W.J.; CONWAY, W.S. et al. Combining yeasts or a bacterial biocontrol agent and heat treatment to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.21, p.87–94, 2000.

LI, G.; YONG-BO, S.; YAN-MIN, G. et al. Infection Process of *Botryosphaeria dothidea* in Apple Fruit. **Journal of Fruit Science**, Beijing, v.23, p.69-72, 2006.

LIANG, P.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A.B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of Differential Display: refinements and optimization. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, p.3269–3275, 1993.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v.257, p.967–971, 1992.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v.257, p.967–971, 1992.

LIU, B.; YU, F.; WU, T. et al., Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.191, p.255–263, 2003.

LIU, J.J.; EKRAMODDOULLAH, A.K.M. Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.270, p.432-441, 2004

LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v.163, p.16–20, 1987.

LOOMIS, W.D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods in Enzymology**, Nova York, v.31, p.528-545, 1974.

LOPEZ-GOMEZ, R. ; GOMEZ-LIM, M. A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, p. 440–442, 1992.

LUNARDI, R.; SEIBERT, E.; PEZZI, E. et al. Tratamento por água quente na qualidade de maçãs 'Fuji' inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea*, em armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.565-570, 2002.

LUNARDI, R.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BENDER, R.J. Imersão em água quente no controle pós-colheita da podridão branca em maçãs 'Fuji'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.431-434, 2003.

LURIE, S. Postharvest heat treatments of horticultural crops. **Horticultural Reviews**, Hoboken, v.22, p.91-121, 1998.

LURIE, S.; FALLIK, E.; KLEIN, J. D. et al. Postharvest heat treatment of apples to control San Jose Scale (*Quadraspidiotus perniciosus* Comstock) and blue mold (*Penicillium expansum* Link) and maintain fruit firmness. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.123, p.110-114, 1998.

LURIE, S.; KLEIN, J.D. Calcium and heat treatments to improve storability of 'Anna' apples. **HortScience**, Alexandria, v.27, v.1, p.36-39, 1992.

LURIE, S.; KLEIN, J.D.; BEN ARIE, R. Postharvest heat treatment as a possible means of reducing superficial scald of apples. **Journal of Horticultural Science**, Alexandria, v.65, p. 503–509, 1990.

LURIE, S.; SABEHAT, A. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. **Postharvest Biology Technology**, Amsterdam, v.11, p.57-62, 1997.

MALHOTRA, K.; FOLTZ, L.; MAHONEY, W.C.; SCHUELER, P.A. Interaction and effect of annealing temperature on primers used in Differential Display RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.26, p.854–856, 1998.

MANNING, K. Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. **Planta**, Berlin, v.205, p.622–631, 1998.

MASMOUDI, K.; BRINI, F.V.; HASSAIRI, A.; ELLOUZ, R. Isolation and characterization of a differentially expressed sequence tag from *Triticum durum* salt-stressed roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.39, p.971-979, 2001.

MCHALE, L.; TAN, X.; KOEHL, P. et al. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. **Genome Biology**, London, v.7, p.212-220, 2006.

MCKENNA, S.T.; VIDALI, L.; HEPLER, P.K. Profilin inhibits pollen tube growth through actin-binding, but not poly-L-proline-binding. **Planta**, Berlin, v.218, p.906-15, 2004.

MCKINNEY, E.C.; KANDASAMY-MKMEAGHER, R.B. Small changes in the regulation of one Arabidopsis profilin isovariant, PRF1, alter seedling development. **The Plant Cell**, Rockville, v.13, p.1179-91, 2001.

MEISEL, L.; FONSECA, B.; GONZLEZ, S. et al. A Rapid and Efficient Method for Purifying High Quality Total RNA from Peaches (*Prunus persica*) for Functional Genomics Analyses. **Biological Research**, Santiago, v.38, p.83-88, 2005.

MELLO, L.M. R.; BORGES JUNIOR, L. Mercado Nacional e Internacional. In: GIRARDI, C. L.(Org.) **Pós-colheita de maçãs**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. v.3, p. 96-103.

MELZER, R.; BERTON, O. Incidência de *Botryosphaeria berengeriana* na cultura da macieira (*Malus domestica*) no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, p.891-898, 1986.

MESKIENE, I.; BOGRE, L.; GLASER, W. et al. MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.1938-1943, 1998.

MIEDES, E.; LORENCES, E. P. Changes in cell wall pectin and pectinase activity in apple and tomato fruits during *Penicillium expansum* infection. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v.86, p.1359-1364, 2006

MITRA D.; KOOTSTRA, A. Isolation of RNA from apple skin. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.11, p.326-332, 1993.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M. et al. Reactive oxygen gene network of Plants. **Trends on Plant Science**, Oxford, v.9, p. 490-499, 2004.

MIYAZAKI, S.; KOGA, R.; BOHNERT, H. J. et al. Tissue- and environmental response-specific expression of 10 PP2C transcripts in *Mesembryanthemum*

crystallinum. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.261, p.307-16, 1999.

MOSER, C.; GATTO, P.; MOSER, M.; PINDO, M.; VELASCO, R. Isolation of functional RNA from small amounts of different grape and apple tissues, **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.26, p.95-100, 2004.

MOYLE, R.; FAIRBAIRN, D. J.; RIPI, J. et al. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.56, p.101-112, 2005.

NAFUSI, B.; BEN-YEHOSHUA, S.; RODOV, V. et al. Mode of Action of Hot-Water Dip in Reducing Decay of Lemon Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.49, p.107-113, 2001.

NAM, Y.W.; TICHIT, L.; LEPERLIER, M. et al. Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.39, p.629–636, 1999.

NAVARRE, D.A.; WOLPERT, T.J. Victorin induction of an apoptotic/senescence -like response in oats. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, p. 237-249, 1999.

NEWCOMB, R.D.; CROWHURST, R. N; GLEAVE, A.P. et al. Analyses of Expressed Sequence Tags from Apple. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.141, p.147-166, 2006.

OH, B.J.; BALINT, D.E.; GIOVANNONI, J.J. A modified procedure for PCR-based Differential Display and demonstration of use in plants for isolation of genes related to fruit ripening. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.13, p.70–81, 1995.

OSTER, A.H. **Tratamento com Calor no Controle de *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not) em maçãs cv. Fuji**. 84f. 2004. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

OSTER, A.H.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BENDER, R.J.; CORRENT, A.R. Heat Treatments to Control White Rot (*Botryosphaeria dothidea*) on 'Fuji' apples. **Acta Horticulturae**, Alexandria, v.712, p.799-804, 2006.

OZTUR, Z.N.; TALAME, V.; DEYHOLOS, M. et al. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.48, p.551-73, 2002.

PAN, Q.; WENDEL, J.; FLUHR, R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. **Journal of Molecular Evolution**, Nova York, v.50, p. 203-213, 2000.

PARISI, L.; LESPINASSE, Y.; GUILLAUMES, J.; KRUGER, J. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the Vf gene. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, p.533–537, 1993.

PARK, S.; SUGIMOTO, N.; LARSON M.D.; et al. Identification of genes with potential roles in apple fruit development and biochemistry through large-scale statistical analysis of expressed sequence tags. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.141, p.811-824. 2006.

PARKER, K.C.; SUTTON, T.B. Effect of temperature and wetness duration on apple fruit infection and eradicant activity of fungicides against *Botryosphaeria dothidea*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.77, p.181-185, 1983.

PATOCCHI, A.; BIGLER, B.; KOLLER, M. et al Vr2: a new apple scab resistance gene. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, p. 1087–1092, 2004.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.22, p.417-453.

PAULL, R.E.; CHEN, N.J. Heat treatment and fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.21, p.21-37, 2000.

PAVONCELLO, D.; LURIE, S.; DROBY, S. et al. A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.111, p.17-22, 2001.

PERRING, M.A. Apple fruit quality in relation to fruit chemical composition. **Acta Horticulturae**, Alexandria, v.258, p.365-372, 1989.

PEYYALA, R.; FARMAN, M.L. *Magnaporthe oryzae* isolates causing gray leaf spot of perennial ryegrass possess a functional copy of the AVR1-CO39 avirulence gene. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.7, p.157–165, 2006.

PHILLIPS, A.J.L.; ALVES, A.; CORREIA, A. et al. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, one-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. **Mycologia**, Nova York, v.97, p. 513–529. 2005

PHILLIPS, D.J.; AUSTIN, R.K. Changes in peaches after hot-water treatment. **Plant Disease**, Saint Paul, v.66, p.487-488, 1982.

PICTON, S.; GRIERSON, D. Inhibition of expression of tomato-ripening genes at high temperature. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.11, p.265-272, 1988.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. Nova York : Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.

PORAT, R.; PASENTESSIS, K.; ROZENTZVIEGA, D. et al. Isolation of a dehydrin cDNA from orange and grapefruit citrus fruit that is specifically induced by the combination of heat followed by chilling temperatures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.120, p. 256–264, 2004.

PORAT, R.; PAVONCELLO, D.; BEN-HAYYIM, G.; LURIE, S. (A heat treatment induced the expression of a Na⁺/H⁺ antiport gene in citrus fruit. **Plant Science**, Limerick, v.162, p.957-963, 2002.

PORAT, R.; PAVONCELLO, D.; LURIE, S. et al. Identification of a grapefruit cDNA belonging to a unique class of citrus dehydrins and characterization of its expression patterns under temperature stress conditions. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, p.598-603, 2002.

PORAT, R.; PAVONCELLO, D.; PERETZ, J. et al. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* and chilling injury in Star Ruby grapefruit by a short hot water rinse and brushing treatment. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Kent, v.75, p.428-432, 2000.

POTENZA, C.; THOMAS S.H.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Genes induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots resistant and susceptible alfalfa cultivars. **Plant Science**, Shannon, v.161, p.289–299, 2001.

PRATELLA, C. Patologia post-raccolta degli ortofrutticoli: stato e sviluppo. **Rivista di Frutticoltura**, Bologna, v.1, p.69-72, 1997.

PRUSKY, D. Mechanisms of Resistance of Vegetables to Postharvest Pathogens. In: BRECHT, J.K.; BARTZ, J.A. **Postharvest Physiology of Vegetables**. 2nd Ed. New York : M. Dekker, 2003. p.581-599.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.34, p.413-434, 1996.

PRUSKY, D.; LICHTER, A. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, v.268, p.1-8, 2006.

RADAUER, C.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. **Biochemical Society Transaction**, Londres, v.30, p.930-935, 2004.

RAMACHANDRAN, S.; CHRISTENSEN, H. E.; ISHIMARU, Y. et al. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v.124, p.1637-1647, 2000.

REID, S.; ROSS, G.S. Up-regulation encoding metallothionein-like proteins storage. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, p.183–189, 1997.

REINDL, J.; RIHS, H.P.; SCHEURER, S. et al. IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.128, p.105-114, 2002.

REINEKE, Q.A.; ZEBITZ, C.P.W. Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.115, p.145–152, 2005.

RETHEL, B.; DELAMS, G.; LAOUEDI, A. Isolation of polysaccharide-free DNA from plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.11, p.333–337, 1993.

REYNOLDS, T.L.; CRAWFORD, R.L. Changes in abundance of an abscisic acid-responsive, early cysteine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.32, p.823-829. 1996.

RHODES, M.J.C. The maturation and ripening of fruits. In: THIMANN, K. **Senescence in Plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1980. p.157-205.

RIBEIRO, P.A. Descrição e comportamento de algumas cultivares de macieira no Sul do Brasil. In: EPAGRI. **Manual da Cultura da Macieira**. Florianópolis, 1986. 562p.

RODRIGUEZ, P.L. Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.38, p.919-927, 1998.

RODRIGUEZ-PEREZ, R.; FERNANDEZ-RIVAS, M.; GONZALEZ-MANCEBO, E. et al. Peach profilin: cloning, heterologous expression and cross-reactivity with Bet v 2. **Allergy**, Copenhagen v.58, p.635-40, 2003.

ROEBROECK, E.J.A.; JANSEN, M.J.W.; MES, J.J. A combined effect of exposure time and temperature of gladiolus cormels. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.119, p.89-96, 1991.

ROY, S.; CONWAY, W.S.; WATADA, A.E. et al. Heat treatment affects epicuticular wax structure and postharvest calcium uptake in 'Golden Delicious' apples. **HortScience**, Alexandria, v. 29, p.1056-1058, 1994.

SAFTNER, R.A.; ABBOTT, J.A.; CONWAY, W.S. et al. Effects of 1-Methylcyclopropene and heat treatments on ripening and postharvest decay in 'Golden Delicious' apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.128, p.120-127, 2003.

SALTVEIT, M.E. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.15, p. 279–292, 1999.

SALZMAN, R.A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K. et al. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, Atenas, v.17, p.11-17, 1999.

SAMS, C. E. et al. Firmness and decay of apples following postharvest pressure infiltration of calcium and heat treatment. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.118, p.623-627, 1993.

SÁNCHEZ-TORRES, P.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Isolation and characterization of genes differentially expressed during the interaction between apple fruit and *Penicillium expansum*. **Plant Molecular Pathology**, Oxford, v.4, p.447-457, 2003.

SANDERSON, P.G.; SPOTTS, R.A. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, p.103-110, 1995.

SANHUEZA, R.M.V. **Desinfecção de água e das câmaras frigoríficas para diminuição do inóculo de *Penicillium expansum***. Pelotas: Embrapa-CNPFT, 1991. (Boletim de Pesquisa).

SANHUEZA, R.M.V. Detecção e Epidemiologia da Podridão Branca da Maçã. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 137-143, 2005.

SANHUEZA, R.M.V.; MAIA, L. **Utilização de luz ultra-violeta (UV-C) na proteção de maçãs Fuji da podridão por *Penicillium expansum***. Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho, 2001.

SASS, P. **Fruit storage**. Budapeste, Hungria : Mezogazda Kiado, 1993. p. 41-53, p.350.

SCHIRRA, M.; AGABBIO, M.; D'AQUINO, S. et al. Postharvest heat conditioning effects on early ripening 'Giulla' cactus pear fruit. **HortScience**, Alexandria, v.32, p.702-704, 1997.

SCHIRRA, M.; D'HALLEWIN, G.; BEN-YEHOSHUA, S.; FALLIK, E. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.21, p.71-85, 2000.

SCHIRRA, M.; D'HALLEWIN, G.; INGLESE, P.; LA MANTIA, T. Epicuticular changes and storage potential of cactus pear [*Opuntia ficus-indica* Miller (L.)] fruit following gibberellic acid preharvest sprays and postharvest heat treatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.17, p.79-88, 1999.

SCHNEIDERBAUER, A.; SANDERMANN, H.; ERNST, D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v.197, p. 91-95, 1991.

SCHUTZ, I.; GUS-MAYER, S.; SCHMELZER, E. Profilin and Rop GTPases are localized at infection sites of plant cells. **Protoplasma**, Nova York, v.227, p.229-235, 2006.

SEEHAUS, K.; TENHAKEN, R. Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.38, p.1225–1234, 1998.

SHOHAM, N.G.; ARAD, T.; ROSIN-ABERSFELD, R. et al. Differential display assay and analysis. In.: PARDEE, A.B.; McCLELLAND, M. (Eds). **Expression Genetics: Differential Display**. Natick: BioTechniques, 1999. p. 211-213. (Update Series)

SNOWDON, A.L. **A color atlas of post-harvest diseases & disorders of fruits & vegetables – general introduction & fruits**. London: Wolfe Scientific, 1990. v.2.

SOLOMOS, T.; KANELLIS, A. K. Hypoxia and fruit ripening. In: **Biology and Biotechnology of the Plant Hormone**. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 239-252.

SOMMER, N.F. Principles of disease suppression by handling practices. In: KADER, A. et al. **Postharvest technology of horticultural crops**. [S.l. : s.n.], 1985. 192 p. p.75-82.

SONG, W.Y.; WANG, G.L.; CHEN, L.L. et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. **Science**, Washington, v.270, p.1804-1806, 1995.

SOZZI, G.O.; CASCONI, O.; FRASCHINA, A.A. Effect of a high temperature stress on endo- β -mannanase and α - and β -galactosidase activities during tomato fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.9, p.49-63, 1996.

SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.33, p.141-151, 2004.

SPEULMAN, E.; BOUCHEZ, D.; HOLUB, E.B. et al. Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v.14, p.467-474, 1998.

SPOTS, R.A.; CHEN, P.M. Prestorage heat treatments for control of decay of pear fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, p.1578-1582, 1987.

SPOTTS, R.A.; CERVANTES, L.A. Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in packinghouses. **Plant Disease**, Saint Paul, v.70, p.106-108, 1986.

SPOTTS, R.A.; CERVANTES, L.A.; FACTEAU, T.J. Integrated control of brown rot of sweet cherry fruit with a preharvest fungicide, a postharvest yeast, modified atmosphere packaging, and cold storage temperature. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.24, p.251-257, 2002.

SPOTTS, R.A.; SANDERSON, P.G.; LENNOX, C.L. et al. Wounding, wound healing and staining of mature pear fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.13, p.27-36, 1998.

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, Washington, v.268, p.661-667, 1993.

SUTTON, T.B. White rot. In: JONES, A.L.; ALDWINCKLE, H.S. (Eds) **Compendium of apple and pear diseases**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1990. p.16-18.

SUTTON, T.B.; ARAUZ, L.F. Influence of temperature and moisture on germination of ascospores and conidia of *Botryosphaeria dothidea*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.75, p.1146-1149, 1991.

SUZUKI, Y.; HIBINO, T.; KAWAZU, T. et al. Extraction of total RNA from leaves of Eucalyptus and some other woody and herbaceous plants using sodium isoascorbate. **BioTechniques**, Natick, v.34, p.988-993, 2003.

TAHIR, I.I. **Control of Pre- and Postharvest Factors to Improve Fruit Quality and Storability**. 65f. 2006. Tese (Doutorado) - Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science, Alnarp, Suécia.

TAI, A.; TANABE, K.; TAMURA, F. et al. Isolation of cDNA clones corresponding to genes expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai): involvement of the ethylene signal transduction pathway in their expression. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.1163-1166, 2000.

TAYLOR, B.; POWELL, A. Isolation of plant DNA and RNA. **Focus**, Rockville, v.4, p.4-6, 1982.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.32, p.1-13, 2004.

TIMMERMAN-VAUGHAN, G.M.; FREW, T.J.; WEEDEN, N.F. Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.101, p.241-247, 2000.

VALSTER, A.H.; VIDALI, L.; HEPLER, P.K. Nuclear localization of profilin during the cell cycle in *Tradescantia virginiana* stamen hair cells. **Protoplasma**, Nova York, v.222, p.85-95, 2003.

VAN DER BIEZEN, E.A.; JONES, J.G.D. The NB-ARC domains: A novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Current Biology**, Londres, v. 8, p.226-R228. 1998.

VAN HOOFF, A.L.M.; HASSINEN, V.H.; HAKVOORT, H.W.J. et al. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (moench) garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.126, p.1519-1526, 2001.

VARELI, K.; FRANGOU-LAZARIDIS, M. Modification of the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method for nuclear RNA isolation. **BioTechniques**, Natick, v.21, p.236-237, 1996.

VENTER, M.; BURGER, A.L.; BOTHA, F.C. Molecular analysis of fruit ripening: the identification of differentially expressed sequences in *Vitis vinifera* using cDNA-AFLP technology. **Vitis**, Siebeldingen, v.40, p.191–196, 2001.

VIDALI, L.; PEREZ, H.E.; VALDES-LOPEZ, V. et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Lancaster, v.108, p.115-23, 1995.

VIERA, L.M. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina- 2005-2006**. Maçã. Instituto Cepa, Florianópolis, p.72-78, 2006. Disponível em: www.cepa.epagri.gov.br/publicações/sintese_2006. Acesso em: nov. 2006.

VINAS, I.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; SANCHIS, V. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.40, p.9-16, 1998.

VRANOVA, E.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M. et al. Oxidative stress, heat shock and drought differentially affect expression of a tobacco protein phosphatase 2C. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.1763-1774, 2000.

WALDEN, R.; CORDEIRO, A.; TIBURCIO, A.F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.113, p.1009–1013, 1997.

WALLACE, D. M. Precipitation of nucleic acids. In: **Methods in Enzymology**. Nova York: Academic Press, 1987.v. 152, p. 41–48.

WAN, C.Y.; WITKINS, T.A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Analytical Biochemistry**, Nova York, v.223, p.7–12, 1994.

WANG, T. W.; LU, L.; WANG, D.; THOMPSON, J. E. Isolation and characterization of senescence-induced cDNAs encoding deoxyhypusine synthase and eucaryotic translation initiation factor 5A from tomato. **Journal of Biological Chemistry**, Nova York, v.276, p.17541–17549, 2001.

WILKINS, T.A.; SMART, L.B. Isolation of RNA from plant tissue. In: **A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, And Synthesis**. Nova York: Wiley-Liss, 1996. p. 21–41.

WILKINSON, J.Q.; LANAHAN, M.B.; CONNER, T.W. et al. Identification of RNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction Differential Display. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.27, p.1097-1108, 1995.

WILLATS, W.G.T.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J.P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, Local, v.49, p.9-27, 2001

WILLERROIDER, M.; FUCHS, H.; BALLMER-WEBER, B. K. et al. Cloning and molecular and immunological characterization of two new food allergens, Cap a 2 and Lyc e 1, profilins from bell pepper (*Capsicum annuum*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*). **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.131, p.245-55, 2003.

WILLS, R.H.; LEE, T.H.; GRAHAM, D. et al. **Postharvest**: an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables. Londres : [s.n.], 1981. 162 p.

WITKE, W. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v.14, p.461-9, 2004.

YAO, Y.X.; LI, M.; LIU, Z. et al. A novel gene, screened by cDNA-AFLP approach, contributes to lowering the acidity of fruit in apple. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.45, p.139-45, 2007.

YOSHIDA, O.; NAKAGAWA, H.; OGURA, N. et al. Effect of heat treatment on the development of polygalacturonase activity in tomato fruit during ripening. **Plant Cell Physiology**, Kioto, v.25, p.505–509, 1984.

ZEGZOUTI, H.; JONES, B.; FRASSE, P. et al. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by Differential Display. **Plant Journal**, Oxford, v.18, p.589–600, 1999.

ZHANG, J.; SWINGLE, P.P. Effects of Curing on Green Mold and Stem-End Rot of Citrus Fruit and Its Potential Application Under Florida Packing System. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, p.834-840, 2005.

ZOHARY, D.; HOPF, M. **Domestication of plants in the old world**. Nova York: Oxford University Press, 2000. 316p.

7. VITA

Adriana Regina Corrent, filha de Madalena Seitenfus Corrent e Luiz Antônio Corrent, nasceu em Videira, Estado de Santa Catarina em 21 de dezembro de 1976.

Cursou o primeiro grau na Escola Básica Anísio Rachadel de Oliveira, no distrito de Anta Gorda, Videira. O segundo grau cursou na Escola Agrotécnica de Videira, no município de Iomerê. Em 1996 ingressou no Curso de Agronomia da faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade do Federal de Pelotas, no município de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. Foi bolsista de iniciação científica do CNPq de 1998 a 2000. Graduiu-se como Engenheiro Agrônomo em 2000.

Em 2001 ingressou no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Agroindustrial do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas. Durante o mestrado desenvolveu o projeto intitulado 1-Metilciclopropeno na Conservação de Maçãs 'Royal Gala' e 'Fuji'. Obteve o grau de Mestre em Ciências em fevereiro de 2003.

Em março de 2003 ingressou no curso de Doutorado em Fitotecnia, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.