

JOÃO PAULO GENEROSO SILVEIRA

**QUALIDADE E DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS DE MAÇÃS EM
RESPOSTA A GIBERELINAS E PROEXADIONA-CÁLCIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Ph.D. Cassandro Vidal Talamini do Amarante

**LAGES – SC
2015**

Silveira, João Paulo Generoso

Qualidade e distúrbios fisiológicos de maçãs em resposta a giberelinas e proexadiona-cálcio/João Paulo Generoso Silveira - Lages, 2015.

139 p.: il.; 21 cm

Orientador: Cassandro Vidal Talamini do Amarante
Tese (doutorado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2015.

1. *Malus domestica* Borkh a. 2. Anti-giberelina b. 3. Crescimento vegetativo c. 4. Distúrbios fisiológicos d. 5. Composição mineral e. I. Silveira, João Paulo Generoso. II. Amarante, Cassandro Vidal Talamini. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. IV. Qualidade e distúrbios fisiológicos de maçãs em resposta a giberelinas e proexadiona-cálcio

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno.

JOÃO PAULO GENEROSO SILVEIRA

**QUALIDADE E DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS DE MAÇÃS EM
RESPOSTA A GIBERELINAS E PROEXADIONA-CÁLCIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias,
da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Banca Examinadora

Orientador:

Prof. Ph.D. Cassandro Vidal Talamini do Amarante
UDESC/Lages – SC

Membros da Banca:

Prof. Dr. Cristiano André Steffens (UDESC/Lages – SC)

Ph.D. Sergio Tonetto de Freitas (EMBRAPA Semiárido)

Dr. Fernando José Hawerth (EMBRAPA Uva e Vinho)

Dr. Clenilso Sehnem Mota (UDESC/Lages – SC)

Lages – SC, 30/09/2015

Aos meus pais, *João Pedro e Marília*, pelo amor, educação e amizade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos são para todas as pessoas que sempre acreditaram e colaboraram para minha formação, mas em especial não poderia deixar de agradecer e de mencionar alguns nomes.

Primeiramente a Deus, por me iluminar nos momentos mais difíceis da minha caminhada, mostrando sempre um novo caminho, uma nova solução. Muito obrigado Deus pelo dom da vida e por todas as pessoas especiais que colocastes nela.

Aos meus pais, João Pedro Silveira e Marília Generoso Silveira, por todo amor, disciplina, apoio e incentivo em todos os dias da minha vida, sempre me dando forças e impulsionando na busca e realização dos meus sonhos. Obrigado por acreditarem em mim. Eu amo vocês.

À minha irmã, Juscila Generoso Silveira, que muito me orgulha por seu caráter, sua dedicação, carinho, empenho e, principalmente, por sempre estar ao meu lado e me amar. Obrigado por tudo. Eu te amo.

À minha namorada, Bruna Casagrande Cechella, por sua compreensão, paciência e amor, e por ser essa pessoa que eu tanto admiro. Eu te amo.

Ao meu orientador professor Cassandro Vidal Talamini do Amarante, por ser grande amigo e uma pessoa muito atenciosa, dedicada e que sempre me ajudou nesta caminhada.

Ao professor Cristiano André Steffens e ao pesquisador Sergio Tonetto de Freitas, pela amizade, ensinamentos e contribuição na co-orientação deste trabalho.

À professora Elizabeth Mitcham, por permitir a realização de parte de trabalho Universidade da Califórnia – Davis (UCDavis).

Ao CAV/UDESC, pelo ensino gratuito e de qualidade e a oportunidade de realizar o Doutorado em Produção Vegetal.

Aos demais professores do curso de Pós-Graduação do

CAV/UDESC, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Programa de Bolsas de Pós-Graduação (FUMDES) da Secretaria de Educação do Estado de Santa Catarina, por conceder a bolsa de doutorado no Brasil e ao CNPq pela bolsa de doutorado sanduíche.

A EPAGRI (Estação Experimental de São Joaquim-SC) por ceder a área e os frutos para o desenvolvimento de parte deste trabalho, em especial ao pesquisador José Massonori Katsurayama.

À minha amiga Aquidauana Miqueloto, pela paciência, amizade e contribuição neste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita (CAV/UDESC), pelo auxílio na execução do projeto e pelos ensinamentos compartilhados durante esse período, em especial ao Vinício Denardi, pela contribuição na execução deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte da minha vida acadêmica, ajudando para a minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

SILVEIRA, João Paulo Generoso. **Qualidade e distúrbios fisiológicos de maçãs em resposta a giberelinas e proexadiona-cálcio**. 2015. 139 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal – Área: Biologia e Tecnologia Pós-Colheita) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, 2015.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da pulverização de macieiras com giberelinas (GAs) e proexadiona-cálcio (ProCa), um inibidor da síntese de giberelinas, sobre o crescimento vegetativo das plantas e a funcionalidade do xilema, composição mineral, expressão dos transportadores de Ca e bombas eletrogênicas, maturação e qualidade pós-colheita dos frutos. Foram elaborados dois experimentos. O primeiro foi desenvolvido em um pomar comercial no município de Elk Grove, Califórnia, EUA, localidade de Clarksburg, em 2013. O segundo foi em um pomar localizado no município de São Joaquim, Santa Catarina, Brasil, nas safras de 2011-2012 e 2012-2013. No trabalho realizado nos EUA, macieiras ‘Braeburn’ foram pulverizadas, em pós-floração (PF; uma pulverização a cada semana, totalizando seis aplicações, iniciando 15 DAPF) e em pré-colheita (PC; uma pulverização a cada semana, totalizando quatro aplicações, iniciando 5 semanas antes da colheita), com ProCa e GA₄₊₇ (ambos com doses de 300 mg L⁻¹). No trabalho realizado no Brasil, macieiras ‘Fuji’ e ‘Gala’ foram pulverizadas PF com ProCa (doses: 165, 330 e 495 mg L⁻¹) e GA₃ (dose: 330 mg L⁻¹), sendo estas doses divididas em três

aplicações (30, 60 e 90 DAPF). Em ambos os experimentos, as plantas do tratamento-controle foram pulverizadas com água e as avaliações realizadas foram: crescimento vegetativo das plantas; funcionalidade do xilema; conteúdo mineral total de Ca e a suas relações com Mg, N e K; e ocorrência de “bitter pit” e demais distúrbios fisiológicos. Adicionalmente, no experimento desenvolvido nos EUA foram avaliados: o teor de cálcio solúvel; a expressão dos genes que codificam para transportadores de Ca e bombas eletrogênicas no tonoplasto; e a maturação e a qualidade dos frutos no momento da colheita e após o período de armazenamento. O crescimento vegetativo de macieiras é menor com a utilização do ProCa em pós-floração, independente da condição experimental. No Brasil, maçãs ‘Gala’ de plantas pulverizadas com GA₃ (330 mg L⁻¹) tendem apresentar maior manifestação de rachaduras, maior relação N/Ca no tecido polpa e menor funcionalidade do xilema no início do desenvolvimento dos frutos, em relação ao ProCa na dose de 495 mg L⁻¹. Nos EUA, o conteúdo de Ca total é maior em maçãs ‘Braeburn’ pulverizadas com ProCa em comparação ao GA₄₊₇, quando ambos os tratamentos foram aplicados em pós-floração. Além disso, a porcentagem de cor vermelha, os valores do índice iodo-amido e a taxa de produção de etileno são menores e a firmeza de polpa superior no momento da colheita em maçãs ‘Braeburn’ de plantas pulverizadas com ProCa em pré-colheita, em relação ao tratamento-controle. No Brasil, a incidência de “bitter pit” e de escaldadura em maçãs ‘Fuji’ é menor com o aumento das doses de ProCa. Nos EUA, frutos de macieiras ‘Braeburn’ pulverizadas com GA₄₊₇ em pós-floração tendem apresentar maior expressão da *Ca-ATPase* e *H⁺-PPase* e maiores valores

de incidência de “bitter pit”, rachaduras e podridões nos frutos, em relação ao tratamento-controle.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Anti-giberelina. Crescimento vegetativo. Frutos. Distúrbios fisiológicos. Composição mineral.

ABSTRACT

SILVEIRA, João Paulo Generoso. 139 f. **Apple fruit quality and physiological disorder in response to gibberellins and prohexadione-calcium.** Dissertation (Doctorate in Plant Science – Area: Postharvest Biology and Technology) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Graduation Program in Plant Sciences, Lages, 2015.

The aim of this study were to evaluate the effect of apple trees spraying with gibberellins (GAs) and prohexadione calcium (ProCa), an inhibitor of gibberellin synthesis, on the vegetative growth and xylem functionality, total mineral content, expression of tonoplast calcium pumps and exchangers and H pumps, maturation and post-harvest fruit quality. Two experiments were developed. The first was developed in a commercial orchard in Elk Grove, California, USA, Clarksburg town, in 2013. The second was accomplished in an orchard at São Joaquim, Santa Catarina, Brazil, in two crop seasons (2011-2012 and 2012-2013). In the study accomplished at the USA, 'Braeburn' apple trees were sprayed weekly after full bloom AFB (six weekly applications, starting 15 days after full bloom - DAFB) and before-harvest (BH, four weekly applications, starting 5 weeks before harvest) with ProCa and GA₄₊₇ (both at 300 mg L⁻¹). In Brazil, 'Fuji' and 'Gala' apple trees were sprayed with ProCa AFB (at concentrations of 165, 330 and 495 g ha⁻¹) and GA₃ (330 g ha⁻¹), which were sprayed at 30, 60 and 90 DAFB. In both the experiments, control plants were sprayed with water and the plant and fruit were evaluated for vegetative growth, xylem functionality, total mineral content and bitter pit incidence and other physiological disorders. Additionally, the USA experiment were evaluated for soluble calcium; expression of tonoplast calcium pumps

and exchangers and H pumps; and fruit quality at harvest and after storage. In both experiments, the vegetative growth decreased with the ProCa AFB plant spraying. In Brazil, the 'Gala' apple from trees sprayed with GA₃ has higher cracking, N/Ca mineral relation in the pulp and lower xylem function at the beginner of fruit development, as compared with ProCa (495 mg L⁻¹). In USA, the Ca concentration is higher in 'Breaburn' apples sprayed with ProCa as compared GA_{4 + 7}, when both treatments were applied AFB. The red color, starch index value and ethylene production were lower and the firmness higher at harvest moment in the 'Breaburn' apple from trees sprayed with ProCa at BH, as compared with control fruits. In Brazil, the bitter pit and scald incidence is lower in 'Fuji' apple sprayed with increasing of ProCa concentrations. In USA, the 'Breaburn' trees sprayed with GA_{4 + 7} AFB have higher *Ca-ATPase* and *H⁺-PPase* expression and bitter pit, cracking and rot incidence in the fruits, as compared with control treatment.

Keywords: *Malus domestica* Borkh. Anti-gibberellin. Fruit. Physiological disorders. Mineral content.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Médias mensais das temperaturas máximas e mínimas e totais da precipitação pluvial mensal de janeiro a outubro de 2013 para a região de Sacramento, Califórnia.....47
- Tabela 2- Porcentagem de ramos do ano classificados de acordo com o seu comprimento médio em macieiras ‘Braeburn’, tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).....54
- Tabela 3- Teor total de Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca) e relações minerais de N/Ca, Mg/Ca, K/Ca, (Mg+K/Ca) e (Mg+K+N)/Ca, no tecido polpa na região distal, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).....61
- Tabela 4- Extravasamento de eletrólitos na polpa, região distal, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).....65
- Tabela 5- Cor vermelha (%) e atributos de cor (L e h°) na epiderme de maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).....83

- Tabela 6- Características químicas do solo (profundidade de 0-20 cm) no pomar de macieiras ‘Fuji’ e ‘Gala’. São Joaquim, SC, 2011.....98
- Tabela 7- Comprimento dos ramos do ano e massa fresca de ramos podados em macieiras ‘Fuji’ e ‘Gala’, tratadas com água (controle), proexadione-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.....103
- Tabela 8- Massa fresca, comprimento, diâmetro e relação comprimento/diâmetro de maçãs ‘Fuji’ e ‘Gala’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadione-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.....106
- Tabela 9- Teores de Ca e valores das relações N/Ca, K/Ca, Mg/Ca, (K+Mg)/Ca e (K+Mg+N)/Ca no tecido da casca e polpa de maçãs ‘Fuji’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadione-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.....112
- Tabela 10- Teores de Ca e valores das relações N/Ca, K/Ca, Mg/Ca, (K+Mg)/Ca e (K+Mg+N)/Ca no tecido da casca e polpa de maçãs ‘Gala’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadione-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.....113
- Tabela 11- Ocorrência de “bitter pit” (BP), podridões e escaldadura em maçãs ‘Fuji’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadione-cálcio

(ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.....119

Tabela 12- Ocorrência de “bitter pit” (BP), podridões, rachaduras e escaldadura em maçãs ‘Gala’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadione-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.....120

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Massa fresca, comprimento e diâmetro de maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC)..... 57
- Figura 2- Números de vasos do xilema do sistema cortical primário coloridos e funcionalidade do xilema no sistema cortical secundário (coloração do córtex, expresso em $L \times h^\circ$, nas regiões proximal e distal de maçãs ‘Braeburn’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF), e colhidas aos 55, 81, 125 e 149 DAPF.....59
- Figura 3- Nível de expressão dos genes de *Ca-ATPase1*, *Ca-ATPase2*, *H⁺-PPase* e *CAX 2* na polpa, região distal, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).....63
- Figura 4- Teor de Ca solúvel total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca, MF) na polpa, região distal, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).....64

- Figura 5- Incidência e índice de “bitter pit” em maçãs ‘Braeburn’, após dois meses de armazenamento e cinco dias a exposição ambiente, colhidas de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).....67
- Figura 6- Incidência de frutos podres e rachados em maçãs ‘Braeburn’, após dois meses de armazenamento e cinco dias a exposição ambiente, colhidas de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).....69
- Figura 7- Relação comprimento/diâmetro de maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (AF) e pré-colheita (PC).....79
- Figura 8- Respiração e produção de etileno em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (PF) e pré-colheita (PC), na colheita.....81
- Figura 9- Coloração no lado mais vermelho de maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (AF) e pré-colheita (PC).....85
- Figura 10- Índice iodo-amido na colheita, de maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (PF) e pré-colheita (PC).....86

- Figura 11- Firmeza de polpa, na colheita e após o armazenamento, de maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita.....89
- Figura 12- Teor de sólidos solúveis, na colheita e após o armazenamento, de maçãs ‘Braeburn’ colhidas de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (PF) e pré-colheita (PC).....91
- Figura 13- Acidez titulável, na colheita e após o armazenamento, de maçãs ‘Braeburn’ colhidas de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (PF) e pré-colheita (PC).....91
- Figura 14- Números de vasos do xilema do sistema cortical primário coloridos, nas regiões proximal e distal de maçãs ‘Fuji’ e ‘Gala’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadiona-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores da safra 2011-2012.....108
- Figura 15- Números de vasos do xilema do sistema cortical secundário (coloração do córtex, expresso em $L \times h^\circ$), nas regiões proximal e distal de maçãs ‘Fuji’ e ‘Gala’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadiona-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores da safra 2011-2012.....109
- Figura 16- Sintomas de rachaduras em maçãs ‘Gala’ (A e B), de escaldadura (C) e de “bitter pit” em ‘Fuji’ (D).....121

LISTA DE ABREVIATURAS

°Brix	Graus Brix
°C	Graus Celsius
AT	Acidez titulável
BP	“bitter pit”
<i>C</i>	<i>Chroma</i>
Ca	Cálcio
CAX	Proteína de transporte do tipo antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$
cm	Centímetro
DAPF	Dias após a plena floração
g	Gramas
GAs	Giberelinas
ha	Hectare
<i>h°</i>	Ângulo <i>hue</i>
i.a.	Ingrediente ativo
ICV	Índice cor vermelha
K	Potássio
kg	Quilograma
<i>L</i>	<i>Lighthness</i>
L	Litro
M	Metro
Meq	Miliequivalente
Mg	Magnésio
mL	Militro

mg	Miligrama
mm	Milímetro
n°	Número
N	Newton (unidade de firmeza de polpa)
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
p	Probabilidade
PC	Pós-colheita
PME	Pectinametilesterase
PF	Pós-floração
pH	Potencial de hidrogênio
ProCa	Proexadiona-cálcio
SS	Sólidos solúveis
SC	Santa Catarina
UR	Umidade relativa do ar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	39
1 DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS, EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE CÁLCIO E BOMBAS ELETROGÊNICAS EM FRUTOS DE MACIEIRAS PULVERIZADAS COM GA₄₊₇ E PROEXADIONA-CÁLCIO EM PÓS-FLORAÇÃO E EM PRÉ-COLHEITA.....	43
1.1 RESUMO.....	43
1.2 INTRODUÇÃO.....	44
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
1.4.1 Comprimento dos ramos do ano das plantas.....	53
1.4.2 Massa fresca, comprimento e diâmetro dos frutos.....	55
1.4.3 Funcionalidade do xilema.....	57
1.4.4 Composição mineral total dos frutos.....	59
1.4.5 Atividade da PME e nível de expressão dos genes que codificam para transportadores de Ca e bombas eletrogênicas no tonoplasto.....	62
1.4.6 Cálcio solúvel total e extravasamento de eletrólitos.....	63
1.4.7 Manifestação de “bitter pit”, rachaduras e podridões nos frutos.....	65
1.4.8 Considerações gerais.....	69
1.5 CONCLUSÕES.....	70
2 MATURAÇÃO E QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE MACIEIRAS PULVERIZADAS COM GA₄₊₇ E PROEXADIONA-CÁLCIO EM PÓS-FLORAÇÃO E PRÉ-COLHEITA.....	71
2.1 RESUMO.....	71
2.2 INTRODUÇÃO.....	72

2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
2.4.1 <i>Relação comprimento/diâmetro (C/D) dos frutos.....</i>	78
2.4.2 <i>Taxa respiratória e de produção de etileno dos frutos.....</i>	79
2.4.3 <i>Desenvolvimento da cor dos frutos.....</i>	81
2.4.4 <i>Índice iodo-amido dos frutos.....</i>	85
2.4.5 <i>Firmeza de polpa dos frutos.....</i>	86
2.4.6 <i>Sólidos solúveis (SS) e acidez titulável (AT) dos frutos.....</i>	89
2.4.7 <i>Considerações gerais.....</i>	92
2.5 CONCLUSÕES.....	92
3 CRESCIMENTO VEGETATIVO DAS PLANTAS E MANIFESTAÇÃO DE DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS NOS FRUTOS EM MACIEIRAS TRADADAS COM GA₃ E DOSES CRESCENTES DE PROEXADIONA-CÁLCIO.....	94
3.1 RESUMO.....	94
3.2 INTRODUÇÃO.....	95
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	97
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
3.4.1 <i>Desenvolvimento vegetativo das plantas.....</i>	102
3.4.2 <i>Massa fresca, comprimento, diâmetro e relação comprimento/diâmetro (C/D) dos frutos.....</i>	103
3.4.3 <i>Funcionalidade do xilema.....</i>	106
3.4.4 <i>Composição mineral dos frutos.....</i>	109
3.4.5 <i>Manifestação de “bitter pit”, escaldadura e rachaduras nos frutos</i>	113
3.4.6 <i>Considerações gerais.....</i>	121
3.5 CONCLUSÕES.....	122
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da macieira é considerada de grande importância econômica para o Sul do Brasil, principalmente, para o estado de Santa Catarina, que é responsável por 60% da produção nacional desta fruta (PEREIRA et al., 2010). Apesar deste cenário, ainda são altos os índices de perdas pós-colheita de maçãs no Brasil, sendo considerado um grande problema que pode associar-se a baixa qualidade e/ou a manifestação de distúrbios fisiológicos nos frutos (AMARANTE et al., 2010).

O “bitter pit” (BP) é um dos principais distúrbios fisiológicos em maçãs, podendo resultar em perdas pós-colheita de até 30% dos frutos, quando provenientes de pomares com elevado risco e em safras agrícolas que propiciam a sua ocorrência (BASSO, 2002). Este distúrbio fisiológico caracteriza-se inicialmente como uma discreta mancha na polpa, de coloração escura, que se torna desidratada com o tempo, ocasionando pequenas depressões na epiderme dos frutos (FERGUSON & WATKINS, 1989) (Figura 16 – D, Capítulo 3). O baixo conteúdo de cálcio (Ca), associado aos elevados níveis de magnésio (Mg), nitrogênio (N), e potássio (K) favorecem a manifestação de BP (AMARANTE et al., 2006). Além disso, a atividade do hormônio giberelina (GAs) nas plantas também pode contribuir para o desenvolvimento deste distúrbio fisiológico (SAURE, 2005).

A aplicação de GAs induz o crescimento vegetativo das plantas (SILVEIRA et al., 2012) e a competição, entre ramos e folhas com os frutos, pelo conteúdo total de Ca nas plantas (SAURE, 2005). Este mesmo tratamento pode promover a expansão nas células dos frutos (NAKAGAWA et al., 1967). Assim, a utilização de GAs pode aumentar o tamanho dos frutos e diminuir o conteúdo total de Ca em maçãs, através da diluição deste elemento mineral (FERGUSON; WATKINS, 1992). O aumento no tamanho dos frutos também pode comprometer a funcionalidade do xilema e o transporte de Ca

para os mesmos (MIQUELOTO et al., 2014), favorecendo a ocorrência do BP. Todavia, este distúrbio não está vinculado apenas ao baixo conteúdo total de Ca nos frutos, mas a homeostase deste mineral à nível celular (FREITAS et al., 2010). Freitas et al. (2012), observaram que o hormônio GAs aumenta a expressão dos genes que codificam a *Ca-ATPase* e *CAX*, transportadores responsáveis pelo deslocamento do Ca para o interior do vacúolo, contribuindo para a redução nos níveis de Ca solúvel apoplástico e para o aumento da ocorrência de distúrbios fisiológicos ocasionados pela deficiência deste elemento mineral nos frutos.

Além da manifestação de BP, a utilização de GAs também pode influenciar na qualidade dos frutos, dependendo da concentração e da época de aplicação destes compostos. Em pré-colheita (PC), o GA₃ pode preservar os atributos de firmeza em frutos de pêssigo (AMARANTE et al., 2005), ameixa (STEFFENS et al., 2009) e caqui (BEN ARIE et al., 1996), e a GA₄₊₇ pode aumentar o teor de sólidos solúveis em maçãs ‘Jonagold’ (AWAD; JADER, 2002). Entretanto, o uso do GA₃ PC pode reduzir o acúmulo de antocianinas na epiderme de maçãs (AWAD; JADER, 2002), comprometendo o desenvolvimento da cor vermelha nos frutos. Quando utilizado em pós-floração (PF), o GA₃ também reduz a acidez titulável em maçãs ‘Catarina’ e aumenta os teores de sólidos solúveis em maçãs ‘Fuji’ (SILVEIRA et al., 2014). Schmidt et al. (2008) também observaram maior degradação de amido e redução na acidez de maçãs ‘Honeycrisp’ tratadas com GA₄₊₇ PF, indicando um avanço na maturação dos frutos. A pulverização das plantas com GA₃ PF também pode aumentar o crescimento vegetativo das plantas (SILVEIRA et al., 2012), reduzindo a exposição dos frutos à luminosidade e o desenvolvimento da cor vermelha na epiderme das maçãs.

O composto proexadiona-cálcio (ProCa) apresenta estrutura similar ao ácido 2-oxoglutárico, sendo co-substrato

das dioxigenases, catalisando hidroxilações que ocorrem no estágio final da biossíntese de GAs (EVANS et al., 1999). Assim, o ProCa atua impedindo a formação de GAs ativas (GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇), através do bloqueio da ação das enzimas dioxigenases (GA₂₀-oxidase e GA₃-oxidase) (DAVIES, 2004), sendo considerado um inibidor da biossíntese de GAs.

Em macieiras, o ProCa PF reduz o crescimento vegetativo das plantas (CLINE et al., 2008; HAWERROTH et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012), podendo aumentar a incidência de luminosidade no interior do dossel e o desenvolvimento de cor vermelha nos frutos, como o observado em maçãs ‘Fuji’ (MEDJDOUB et al., 2005) e em peras ‘Forelle’ (SMIT et al., 2005). Porém, em maçãs ‘Royal Court’, o aumento nas doses de ProCa PF comprometeu a porcentagem de cor vermelha nos frutos (CLINE et al., 2008). De forma similar, quando utilizado em PC, o ProCa proporcionou a diminuição no desenvolvimento da cor vermelha em maçãs ‘Braeburn’ (BIZJAK et al., 2012).

A redução no crescimento vegetativo em resposta ao ProCa PF também pode diminuir a competição entre folhas e frutos pelo conteúdo total de Ca disponível, resultando na menor manifestação do BP (MEDJDOUB et al., 2004; SILVEIRA et al., 2012). Ainda, Freitas et al. (2012) observaram um incremento no conteúdo de Ca solúvel apoplástico e uma redução no desenvolvimento do distúrbio fisiológico associado a deficiência de Ca em frutos de tomate provenientes de plantas tratadas semanalmente, desde a floração até a colheita, com o ProCa. Da mesma forma, o tratamento com ProCa pode ser uma alternativa para reduzir a manifestação de BP em maçãs.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o crescimento vegetativo das plantas e a funcionalidade do xilema, composição mineral, expressão dos transportadores

de Ca e bombas eletrogênicas no tonoplasto, maturação e qualidade pós-colheita dos frutos.

1 DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS, EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE CÁLCIO E BOMBAS ELETROGÊNICAS EM FRUTOS DE MACIEIRAS PULVERIZADAS COM GA₄₊₇ E PROEXADIONA-CÁLCIO EM PÓS-FLORAÇÃO E EM PRÉ-COLHEITA

1.1 RESUMO

O “bitter pit” (BP) é um distúrbio fisiológico em maçãs que tem sido associado à deficiência de cálcio (Ca) nos frutos, e pode estar relacionado com aumento na atividade de giberelinas nas plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da pulverização de macieiras em pós-floração (PF; uma pulverização a cada semana totalizando seis aplicações, iniciando 15 DAPF) e em pré-colheita (PC; uma pulverização a cada semana totalizando quatro aplicações, iniciando 5 semanas antes da colheita) com um inibidor da síntese de giberelinas, o proexadiona-cálcio (ProCa; 300 mg L⁻¹), e com GA₄₊₇ (300 mg L⁻¹) sobre a expressão de transportadores de cálcio e bombas eletrogênicas, a composição mineral e a ocorrência de distúrbios fisiológicos nos frutos. As plantas do tratamento-controle foram pulverizadas com água. O experimento foi conduzido em um pomar comercial no município de Elk Grove, Califórnia, EUA, localidade de Clarksburg, em 2013. Para a funcionalidade do xilema foram coletados frutos dos tratamentos controle, GA₄₊₇ PF e ProCa PF, aos 55, 81, 125 e 149 DAPF. Na maturação comercial, foi realizada a colheita e a avaliação de extravasamento de eletrólitos, expressão dos genes que codificam para transportadores de Ca e bombas eletrogênicas no tonoplasto e análise mineral total de Ca (e sua relação com Mg, K e N) e solúvel total de Ca nos frutos. Após o armazenamento em atmosfera refrigerada por dois meses (0±0,5 °C e 90-95% UR), seguido de cinco dias a exposição ambiente (25±2,0 °C e 60-70% UR), os frutos foram avaliados quanto a incidência de

rachaduras, podridões e BP, e índice de BP. As plantas pulverizadas com ProCa PF tiveram menor comprimento dos ramos do ano. Apesar de não diferir do controle, os frutos do tratamento ProCa PF apresentaram maior conteúdo de Ca total e menores relações de $(Mg+K)/Ca$ e $(K+Mg+N)/Ca$, em relação aos frutos do tratamento GA_{4+7} PF. Comparando as mesmas épocas de aplicação dos tratamentos, o GA_{4+7} aumentou a expressão da *Ca-ATPase 2* e a incidência de BP nos frutos, em relação ao ProCa, sem diferir do controle. Os resultados indicam que o GA_{4+7} PF aumenta a expressão da *Ca-ATPase 1* e *H⁺-PPase*, aumenta a incidência de “bitter pit”, rachaduras e podridões e não altera o conteúdo total de Ca em maçãs, quando comparado ao tratamento-controle.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Anti-giberelina. Composição mineral. Distúrbio fisiológico. Crescimento vegetativo.

1.2 INTRODUÇÃO

O “bitter pit” (BP) é um dos principais distúrbios fisiológicos encontrado em maçãs, sendo geralmente associado ao baixo conteúdo de cálcio (Ca) nos frutos (FERGUSON e WATKINS, 1989; AMARANTE et al., 2011) e elevados teores de outros minerais, principalmente o magnésio (Mg), o potássio (K) e o nitrogênio (N) (AMARANTE et al., 2006). Entretanto, a manifestação do BP também pode estar associada à maior atividade das giberelinas (GAs) nas plantas (SAURE, 2005).

As GAs são um grupo de hormônios vegetais sintetizado em sementes e frutos em desenvolvimento, e desempenham diversas funções fisiológicas, incluindo a expansão das células dos frutos (NAKAGAWA et al., 1967). Esses hormônios presentes no tecido vegetal induzem a

expressão de alguns genes que codificam para a xiloglucano endotransglicosilase (XET), enzima que atua aumentando a viscosidade da parede celular pelo o enfraquecimento das cadeias de xiloglucano (ATKINSON et al., 2009; HAN et al., 2015), permitindo o processo de expansão das células em resposta ao turgor celular. Portanto, aplicações exógenas de GAs podem aumentar o crescimento dos frutos (tamanho). Esta condição pode induzir a compressão e o colapso dos elementos de vaso de xilema, reduzindo a sua funcionalidade e o aporte de Ca aos frutos (DRAŽETA et al., 2004; MIQUELOTO et al., 2014). Além disso, as GAs ativas promovem o crescimento vegetativo das plantas e a competição entre folhas e frutos pelo Ca total disponível, diminuindo a translocação de Ca aos frutos, aumentando a sua suscetibilidade ao BP (SAURE, 2005).

O composto proexadiona-cálcio (ProCa) apresenta estrutura similar ao ácido 2-oxoglutárico, sendo co-substrato das dioxigenases, catalisando hidroxilações que ocorrem no estágio final da biossíntese de GAs (EVANS et al., 1999). Assim, o ProCa atua impedindo a formação de GAs ativas (GA_1 , GA_3 , GA_4 e GA_7), através do bloqueio da ação das enzimas dioxigenases (GA_{20} -oxidase e GA_3 -oxidase) (DAVIES, 2004), sendo considerado um inibidor da biossíntese de GAs. Portanto, quando pulverizado em macieiras, o ProCa pode reduzir o crescimento vegetativo das plantas (CLINE et al., 2008; HAWERROTH et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012), possibilitando uma menor competição entre folhas e frutos pelo conteúdo de Ca total disponível, podendo diminuir a manifestação de BP nos frutos (GREENE, 1991).

Entretanto, o desenvolvimento do BP nem sempre está relacionado ao conteúdo total de Ca nos frutos. A homeostase anormal do Ca a nível celular, associada ao esgotamento do Ca livre no apoplasto pode predispor o desenvolvimento deste distúrbio fisiológico (FREITAS et al., 2010). O aumento na

expressão da pectinametilesterase (PME) pode induzir o aprisionamento do Ca à parede celular (FREITAS et al., 2010), comprometendo o conteúdo de Ca na região do apoplasto necessário para a manutenção da integridade da membrana plasmática. Além disso, o decréscimo do Ca livre no apoplasto pode ocorrer através do transporte deste mineral para o interior do vacúolo, ficando complexados com fenóis, oxalatos e fosfatos (WHITE; BROADLEY, 2003). O movimento do Ca para o vacúolo ocorre pela atividade da bomba *Ca-ATPase*, usando o ATP como fonte de energia, e da proteína de transporte do tipo antiporte Ca^{2+}/H^{+} (*CAX*), que utiliza o gradiente eletroquímico para o bombeamento do Ca para o interior desta organela (FREITAS et al., 2010). Portanto, a atividade da PME e desses transportadores no tonoplasto são importantes, pois interferem na homeostase do Ca a nível celular e na manifestação de BP nos frutos.

A aplicação exógena de GAs desde o início do desenvolvimento dos frutos aumentou a expressão do gene que codifica a *Ca-ATPase* e *CAX* em tomates, contribuindo para a redução nos teores de Ca solúvel apoplático e para o aumento da ocorrência de distúrbios fisiológicos ocasionados pela deficiência deste elemento mineral (FREITAS et al., 2012a). Portanto, a utilização do ProCa pode reduzir os níveis de GAs ativas nos frutos, sendo uma alternativa para diminuir a expressão dos transportadores de Ca a nível celular (FREITAS et al., 2012a), podendo auxiliar no incremento do conteúdo Ca solúvel apoplático e na redução da manifestação do BP nos frutos de macieiras.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de transportadores de cálcio e bombas eletrogênicas, a composição mineral e a ocorrência de distúrbios fisiológicos em maçãs 'Breaburn' em resposta ao uso do proexadonacálcio (ProCa) e da giberelina (GA_{4+7}) em pós-floração e em pré-colheita.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em um pomar comercial de macieiras ‘Braeburn’ com 10 anos de idade, conduzidas com líder central, em sistema de média densidade, com espaçamento de 2,0 m × 6,0 m, localizado no município de Clarskburg, próximo à cidade de Sacramento, Califórnia, EUA (38°21’23,27’’N, 121°32’13,62’’O e altitude de 123 m). No pomar tinha um sistema de irrigação por aspersão e as plantas foram irrigadas de maio até agosto de 2013, durante a realização do experimento. O raleio manual dos frutos foi realizado, deixando dois frutos por cacho floral, como forma de manter a uniformidade de carga de frutos por macieiras entre os tratamentos. As médias mensais das temperaturas máximas e mínimas e a precipitação pluvial mensal, observadas ao longo da execução do experimento, encontram-se na tabela 1.

Tabela 1- Médias mensais das temperaturas máximas e mínimas e totais da precipitação pluvial mensal de janeiro a outubro de 2013 para a região de Sacramento, Califórnia.

Meses	Temperatura média (°C)		Precipitação (mm)
	Máxima	Mínima	
Janeiro	13,3	0,2	24,4
Fevereiro	16,8	2,2	9,1
Março	20,8	6,9	35,0
Abril	25,5	9,8	17,6
Maiο	28,1	12,4	7,7
Junho	31,8	14,2	5,6
Julho	33,9	15,2	0,0
Agosto	32,5	15,0	0,0
Setembro	29,5	13,9	14,9
Outubro	25,7	8,5	0,0

Fonte: U.S. Climate data

As plantas foram pulverizadas com água (tratamento

controle), GA₄₊₇ e ProCa (ambos os produtos na dose de 300 mg L⁻¹), após a floração (PF) e em pré-colheita (PC). As aplicações PF iniciaram no dia 15/04/2013, 15 dias após a plena floração (DAPF), sendo repetidas a cada semana até completar seis aplicações. Já as aplicações PC iniciaram dia 05/08/2013 (125 DAPF), cinco semanas antes da colheita comercial (04/09/2013), sendo está repetida a cada semana até completar quatro aplicações. O volume de calda utilizado foi de 1.000 L.ha⁻¹ permitindo o completo molhamento do dossel foliar das plantas. Não foi utilizado espalhante adesivo junto aos tratamentos. Como fonte de proexadione-cálcio foi utilizado o produto comercial Apogee[®] (contendo 27,5% de ingrediente ativo) e de giberelina o Typrus[®] (contendo 2,0% de ingrediente ativo).

Em outubro de 2013 (180 DAPF), foram realizadas avaliações de comprimento médio dos ramos do ano. Essa avaliação ocorreu no terço médio das plantas, selecionando-se de forma aleatória 15 ramos de cada lado da planta. A medida foi obtida com o auxílio de uma fita métrica e os resultados expressos em cm. Após os ramos foram agrupados em quatro categorias: ramos menores que 30 cm; ramos com comprimento maior ou igual a 30 e menores que 60 cm; ramos com comprimento maior ou igual a 60 e menores que 90 cm; e ramos com comprimento maior ou igual a 90 cm. A porcentagem de ramos em cada categoria foi determinada considerando: [(valor absoluto de ramos na categoria/total de ramos avaliados) x 100].

Para a determinação da funcionalidade do xilema, foram colhidos 15 frutos por tratamento, apenas dos tratamentos controle, ProCa PF e GA₄₊₇ PF, aos 55, 81, 125 e 149 DAPF.

A funcionalidade do xilema foi avaliada utilizando o método descrito por Dražeta et al. (2004). Os frutos foram colhidos com o pedúnculo, o qual foi seccionado aproximadamente 1 mm da sua base e imediatamente imergido

em uma solução de corante Safranina 1%. O corante foi infiltrado nos frutos por cerca de 6 h, e para a maior transpiração os mesmos foram submetidos a uma temperatura de $25 \pm 2,0$ °C e umidade relativa (UR) de 70 ± 10 %, com a utilização de um ventilador para remover o efeito da camada limítrofe de ar. Posteriormente, os frutos infiltrados foram cortados transversalmente, obtendo duas seções de 10 mm de espessura, uma na porção distal (região pistilar) e outra na proximal (região de inserção do pedúnculo). Após, cada seção foi avaliada quanto ao número e intensidade de coloração dos feixes nos sistemas vasculares cortical primário e secundário, respectivamente. O número de vasos de xilema do sistema cortical primário foi determinado pelo método de análise visual. A quantificação da intensidade de coloração dos vasos do xilema, no sistema vascular cortical secundário, foi feita de acordo com o método descrito por Miqueloto et al. (2014), sendo expresso em $L \times h^\circ$. Para a determinação da intensidade de coloração do córtex foi quantificada os valores de brilho (L) e ângulo 'hue (h°) do córtex, com um colorímetro Minolta, modelo CR 400. O aumento nos valores de $L \times h^\circ$ indicam uma redução na coloração dos vasos do xilema no sistema cortical secundário e perda na funcionalidade do xilema.

Na maturação comercial (160 DAPF) foi realizada a colheita dos frutos, os quais foram separados em amostras contendo aproximadamente 150 frutos por unidade amostral. Uma subamostra de 15 frutos por unidade amostral foi utilizada para a determinação da atividade enzimática da PME, extravasamento de eletrólitos, análise mineral total e de Ca solúvel total, massa fresca, comprimento e diâmetro. Outra subamostra de 5 frutos por unidade amostral foi utilizada para a avaliação da expressão gênica dos transportadores de Ca (*Ca-ATPase 1 e 2*, *CAX₂*, *CAX₃*, *CAX₆*) e bombas eletrogênicas (*H⁺-PPase* e *V-ATPase*) expressos de forma específica no tonoplasto de células dos frutos. Os demais frutos foram submetidos à análise da incidência de “bitter pit”, de podridão,

de rachaduras, e para a avaliação do índice de BP, após o armazenamento em câmara fria convencional.

Para a determinação da atividade da PME na polpa dos frutos, utilizou-se a metodologia descrita por Hagerman & Austin (1986). Os extratos foram obtidos pela maceração de 1 g de tecido da polpa da região distal do fruto, seguido da adição de 1 mL do meio de extração (cloreto de sódio 2M e tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 6,5). O extrato obtido foi acondicionado em tubo de eppendorf e colocados em centrífuga (Personal Centrifuge/Dr-Spin, Korla) a 15.000 rpm por 10 minutos. A atividade da PME foi determinada pela adição de 250 μ L do extrato enzimático em solução tampão (pH 7,8) contendo HEPES-NaOH 0,1M, azul de bromotimol 1g L⁻¹ e pectina cítrica 5 mg L⁻¹, seguido de leitura da absorbância em espectrofotômetro (Epoch, Biotec) no comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ min⁻¹.

O extravasamento de eletrólitos (como medida da permeabilidade de membranas) foi determinado na polpa, na região distal dos frutos. O tecido da casca foi removido até uma profundidade de 1 mm e descartado. Com a utilização de um perfurador metálico de 11 mm de diâmetro, foram removidos 4 cilindros da polpa com 10 mm de diâmetro e 5 mm de espessura de três frutos. Os cilindros foram lavados durante 30s com água desionizada e em seguida acondicionados em um tubo Falcon contendo 30 mL de uma solução de manitol (0,2 mol/L), e mantidos a temperatura de 25 \pm 1 °C (banho-maria). As leituras foram realizadas 1, 2, 3 e 4 horas após o acondicionamento dos cilindros na solução de manitol, com o auxílio de um condutivímetro (Fischer Scientific). Depois da última leitura, os cilindros em solução de manitol foram congelados a -20°C por 24 horas. Após, foram descongelados por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, e avaliada a condutividade da solução. Os valores foram

expressos em porcentagem de condutividade, segundo a metodologia descrita por Saltveit (2002).

Os teores totais de Ca, Mg, K e N (mg kg^{-1} de massa seca) foram determinados somente no tecido polpa, na porção distal dos frutos, no momento da colheita. Para isso, as amostras de polpa da região distal foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas para posterior análise mineral. Os teores de N foram determinados segundo o método descrito por AOAC (2006). O K foi extraído com ácido acético 2% e quantificado por espectrofotômetro de chamas (JOHNSON & ULRICH, 1959). Os teores de Ca e Mg foram determinados com auxílio de um espectrofotômetro de plasma induzido por argônio (ICP/OES) (MEYER & KELIHER, 1992).

Para a determinação do teor de Ca solúvel total ($\mu\text{g kg}^{-1}$ de massa fresca), também foi utilizado o tecido polpa na região distal dos frutos, localizado 0,5 cm logo abaixo da casca dos frutos (amostra de ~70g) onde foi extraído o suco com auxílio de um processador manual. O teor de Ca solúvel total foi quantificado com auxílio de um espectrofotômetro de plasma induzido por argônio (ICP/OES).

A massa fresca dos frutos foi quantificada com o auxílio de uma balança digital de precisão (0,0001g) modelo GE1302, marca Sartorius.

O comprimento e diâmetro dos frutos foram determinados com o auxílio de um paquímetro manual (Universal, Mitutoyo, 300 mm, leitura de 0,05 mm), sendo os resultados expressos em milímetros.

O RNA total foi extraído da polpa do fruto com o reagente PureLink[®] Plant RNA (Ambion[®], NY, USA). A concentração e a qualidade do RNA foram aferidas em um espectrofotômetro UV (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) com comprimentos de onda de 260 e 280, para posterior cálculo da relação de absorbância 260nm/280 nm. Para todas as amostras, 5 μg do RNA total foi submetido à transcriptase reversa utilizando o SuperScript III

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com o protocolo descrito no kit. Para a análise de PCR em tempo real (*Real Time PCR*) quantitativo foi adicionado 1×SYBR green (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) para cada amostra contendo aproximadamente 100 ng de cDNA sintetizado. Os dados obtidos foram normalizados baseados no gene controle ubiquitina. Todos os *primers* desenhados continham 20 nucleotídeos e a temperatura de desnaturação foi de $58 \pm 3^\circ\text{C}$. Para os transportadores *V-ATPase*, *H⁺-Pirofosfatase*, *CAX/H⁺* e *Ca-ATPases*, no tonoplasto do vacúolo, a sequências de nucleotídeos para *Malus domestica* Burk foram obtidos no Expressed Sequence Tags (EST) database (<http://cgf.ucdavis.edu/home/>). Os transportadores foram nomeados como *Ca-ATPase1* (CTG1060377) (NCBI: XM 002325215), *Ca-ATPase2* (CTG1063686) (NCBI: AJ310848), *CAX2/H⁺* (CTG1073422) e (NCBI: NM_112177), *CAX3/H⁺* (CTG1076982) (NCBI: XM_002533684), *H⁺-Pirofosfatase* (EB143723) (NCBI: NM 101437) e *V-ATPase* (CTG1058311) (NCBI: NM_001036222), conforme descrito por Freitas et al. (2010).

A incidência de frutos podres, rachados e com BP, e a avaliação de índice de BP, foram obtidas em frutos armazenados por dois meses em atmosfera do ar a $0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 90-95 % de UR, seguido de cinco dias a exposição ambiente ($25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e 60-70% UR). O índice de “bitter pit” foi determinado utilizando uma escala de 6 níveis de danos visuais na casca: nenhuma mancha (0), uma mancha (1), duas manchas (2), três manchas (3), quatro manchas (4), cinco manchas (5) e mais que cinco manchas (6) de BP. Para o cálculo do índice foi utilizado a seguinte fórmula, decrita por Pesis et al. (2009):

$$\text{Índice de "bitter pit"} = \sum_0^6 \frac{(\text{nível do índice}) \times (\text{n}^\circ \text{ frutos a este nível})}{(\text{n}^\circ \text{ total de frutos})}$$

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, contendo cinco tratamentos e seis blocos, sendo cada unidade amostral constituída de uma planta. Os dados obtidos nos diferentes tratamentos foram inicialmente submetidos ao teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) para verificar a homogeneidade das variâncias, e ao teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO e WILK, 1965), para verificar a normalidade dos resíduos. Os dados de porcentagem de ramos do ano classificados de acordo com o seu comprimento médio, de incidência de frutos com podridão, rachaduras e BP, e a avaliação de índice de BP, foram submetidos à transformação arco seno $[(x+5)/100]^{1/2}$ antes de serem submetidos à ANOVA. As médias de tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2002).

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Comprimento dos ramos do ano das plantas

As plantas pulverizadas com GA₄₊₇ PF (iniciando 15 DAPF) tiveram maior frequência de ramos com comprimento entre 60 e 90 cm e menor com comprimento entre 30 e 60 cm, comparativamente aos demais tratamentos (Tabela 2). A porcentagem de ramos menores que 30 cm e com comprimento entre 30 e 60 cm foi maior em plantas tratadas com o ProCa PF, em relação aos demais tratamentos (Tabela 2). Estes resultados indicam maior comprimento dos ramos em plantas pulverizadas com GA₄₊₇ PF, ao passo que o ProCa PF reduziu este atributo.

A utilização do ProCa diminui a formação de GAs ativas (DAVIES, 2004), proporcionando a inibição do alongamento e divisão celular, restringindo o desenvolvimento vegetativo das plantas quando tratadas com este composto na fase inicial de crescimento dos ramos (CLINE et al., 2008; HAWERROTH et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012).

As pulverizações das plantas em PC (iniciando 125 DAPF) com GA₄₊₇ e ProCa não modificaram o comprimento médio dos ramos comparado ao tratamento-controle, considerando a frequência de ramos em cada classe estabelecida (Tabela 2). Provavelmente, o comportamento está associado ao baixo crescimento vegetativo das plantas entre 125 e 180 DAPF (data da avaliação do comprimento dos ramos do ano), em resposta a redução nas temperaturas média máxima e mínima (Tabela 1) e no fornecimento de água pelo sistema de irrigação durante este período. Adicionalmente, segundo Byers & Yoder (1999) a maior parte do crescimento vegetativo de plantas de macieira se concentra durante os 30 DAPF. Sendo assim, o ProCa (330 mg L⁻¹) em dose única foi mais eficiente na redução do comprimento médio e da massa fresca média dos ramos podados em macieiras ‘Imperial Gala’, quando aplicado entre 20 e 28 DAPF (HAWERROTH et al., 2012), indicando que para o controle vegetativo de macieiras, este composto deve ser aplicado durante a fase inicial de crescimento dos ramos.

Tabela 2- Porcentagem de ramos do ano classificados de acordo com o seu comprimento médio em macieiras ‘Braeburn’, tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).

Tratamentos	Comprimento médio dos ramos do ano			
	< 30 cm	≥ 30 cm e < 60 cm	≥ 60 cm e < 90 cm	≥ 90 cm
	-----%-----			
Controle	0,00 b	23,0 b	41,0 ab	35,8 a
GA ₄₊₇ (PF)	0,00 b	2,25 c	57,5 a	40,2 a
ProCa (PF)	22,5 a	72,5 a	5,00 c	0,00 b
GA ₄₊₇ (PC)	2,00 b	33,2 b	27,5 b	37,0 a
ProCa (PC)	0,00 b	41,2 b	24,2 b	34,2 a
CV (%)	91,7	50,9	43,2	49,8

Fonte: produção do próprio autor. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

1.4.2 Massa fresca, comprimento e diâmetro dos frutos

A massa fresca (MF) e o diâmetro dos frutos foram similares entre o controle e os demais tratamentos aos 160 DAPF (Figura 1).

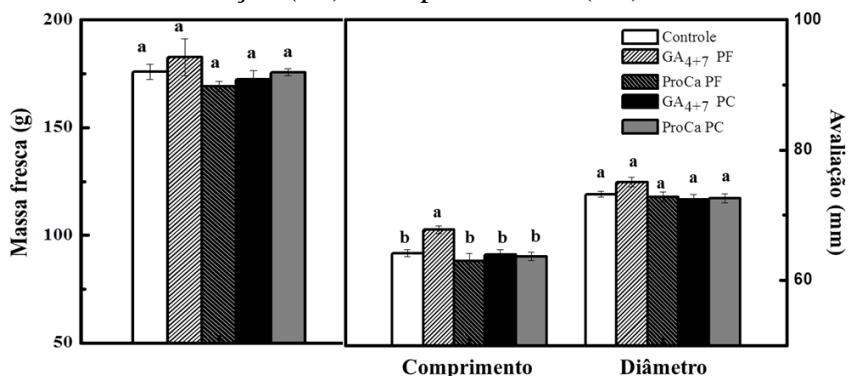
Segundo Lakso e Goffinet (2013), o aumento no tamanho dos frutos, representados pela MF, é decorrente dos processos de divisão e expansão celular ao longo do seu desenvolvimento. O número de células dos frutos é determinado nos primeiros 30 dias de desenvolvimento (LAKSO et al., 1995; LAKSO & GOFFINET, 2013) pelo processo de divisão celular. Entre 30 e 120 DAPF, o aumento na MF dos frutos é de forma linear, sendo requerida uma demanda constante de carbono aos frutos para uma taxa de expansão celular contínua (LAKSO et al., 1995). A quantia de fotoassimilados destinada aos frutos pode ter influenciado no acúmulo de MF dos mesmos. O maior crescimento médio dos ramos do ano em plantas pulverizadas com GA₄₊₇ PF (Tabela 2) pode induzir a competição entre a parte vegetativa e reprodutiva pelos fotoassimilados disponíveis. Possivelmente, isto comprometeu o aporte de carbono necessário para o aumento da MF dos frutos em plantas pulverizadas com GA₄₊₇ PF, resultando em frutos com MF similar aos demais tratamentos. A utilização do ProCa pode reduzir os níveis de GAs ativas (DAVIES, 2004), comprometendo o efeito deste hormônio na expansão das células dos frutos. Porém, este comportamento parece ser suprimido pelo maior aporte de fotoassimilados aos frutos, em resposta ao menor crescimento vegetativo das plantas pulverizadas com o ProCa PF. Desta forma, isto pode ter colaborado para que os frutos de plantas pulverizadas com ProCa PF atingissem a mesma MF que os demais tratamentos.

A utilização da GA₄₊₇ PF proporcionou o incremento no comprimento dos frutos (Figura 1). Este comportamento é decorrente do aumento no tamanho das células localizadas na

região apical, que é mais sensível as GAs, comparado à porção proximal dos frutos (NAKAGAWA et al., 1967). Já o composto ProCa, quando aplicado na mesma época, não influenciou no diâmetro e comprimento dos frutos, em relação ao controle. Hawerth (2010) também não observou diferença no comprimento e diâmetro de maçãs 'Fuji Suprema' submetidas a diferentes doses de ProCa em pós-floração. Possivelmente, o efeito do ProCa PF na redução do comprimento dos ramos do ano das plantas pode contribuir para o aporte de fotoassimilados e para o aumento do conteúdo de água dos frutos (MEDJDOUB et al., 2004). Desse modo, pode ocorrer um aumento da pressão de turgor e conseqüentemente uma diminuição do efeito deste composto na redução da expansão e alongação celular. Assim, pode-se explicar a similaridade obtida entre o comprimento e o diâmetro dos frutos do controle e do tratamento ProCa PF.

As pulverizações de GA₄₊₇ PC e ProCa PC (iniciando 125 DAPF) não influenciaram na massa fresca, comprimento e diâmetro dos frutos (Figura 1). A partir de 120 DAPF o crescimento dos frutos é menos expressivo, decorrente do declínio na expansão das células (LAKSO et al., 1995), reduzindo o efeito dos tratamentos em pré-colheita sobre a massa fresca e o formato (comprimento e diâmetro) dos frutos.

Figura 1- Massa fresca, comprimento e diâmetro em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).



Fonte: produção do próprio autor. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

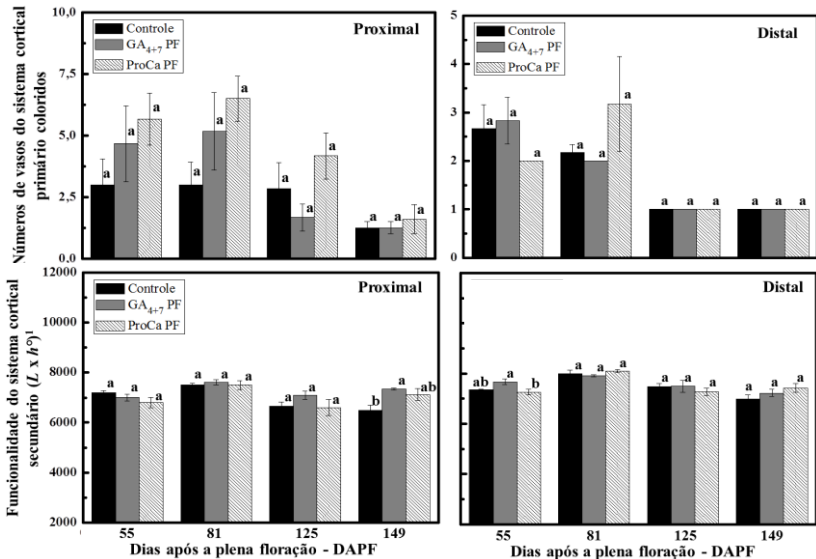
1.4.3 Funcionalidade do xilema

O número de vasos do xilema coloridos do sistema vascular primário reduziu durante o desenvolvimento dos frutos (55 aos 149 DAPF) em todos os tratamentos (Figura 2). Na região proximal e distal, não foi observado diferença entre os tratamentos para o número de elementos de vaso do sistema vascular primário coloridos (Figura 2).

Os frutos de plantas tratadas com GA₄₊₇ PF exibiram menor funcionalidade do xilema do sistema cortical secundário, expressa em coloração do córtex ($L \times h^\circ$), na região proximal aos 149 DAPF em relação ao controle, e na região distal aos 55 DAPF em relação ao ProCa PF (Figura 2). Estes resultados indicam um pequeno efeito do tratamento GAs PF sobre a redução na funcionalidade do xilema durante a fase de desenvolvimento dos frutos. Freitas et al. (2012a) observaram uma redução na funcionalidade do xilema no início do desenvolvimento em frutos de tomate, quando submetidos ao tratamento com GAs. Possivelmente, a aplicação exógena de

GAs modifica o balanço hormonal no interior dos frutos. Isto reduz a relação auxina/GAs, proporcionando uma menor diferenciação nos elementos de vasos do xilema (FREITAS & MITCHAM, 2012b) e inibindo o desenvolvimento deste tecido vascular responsável pelo transporte de Ca aos frutos. Este fator pode ter contribuído para a redução na funcionalidade do xilema do sistema cortical secundário em frutos submetidos ao tratamento GA₄₊₇ PF.

Figura 2- Números de vasos do xilema do sistema cortical primário coloridos e funcionalidade do xilema no sistema cortical secundário (coloração do córtex, expresso em $L \times h^\circ$, nas regiões proximal e distal, em maçãs ‘Braeburn’, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF), e colhidas aos 55, 81, 125 e 149 DAPF.



Fonte: produção do próprio autor. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹ Aumento nos valores de $L \times h^\circ$ indica redução na coloração dos vasos do xilema no sistema cortical secundário e perda na funcionalidade do xilema.

1.4.4 Composição mineral total dos frutos

Apesar de não diferir do tratamento controle, o GA₄₊₇ PF diminuiu o conteúdo total de Ca e aumentou as relações (Mg+K)/Ca e (K+Mg+N)/Ca na região distal dos frutos, em relação ao tratamento ProCa PF (Tabela 3). Silveira et al. (2012) também observaram a redução no teor total de Ca e aumento nas relações K/Ca e (K+N+Mg)/Ca no tecido casca de maçãs ‘Fuji’ tratadas com GA₃ em pós-floração, em

comparação aos tratamentos controle e ProCa em pós-floração. Nossos resultados sugerem que o aumento de 26,3% no crescimento vegetativo das plantas submetidas ao tratamento GA₄₊₇ PF, e a redução de 51,7% nesta variável no tratamento ProCa PF, em relação ao controle, podem influenciar na composição mineral total de Ca nos frutos.

A utilização do paclobutrazol, outro inibidor da síntese de GAs, reduziu o crescimento vegetativo das plantas e a manifestação de “bitter pit”, em resposta ao aumento no teor de Ca em maçãs (GREENE, 1991). Possivelmente, a diminuição no vigor vegetativo das plantas tratadas com paclobutrazol contribuiu para uma menor competição entre ramos vegetativos e frutos em desenvolvimento pelo aporte de Ca, resultando em maior conteúdo total de Ca em maçãs (GREENE, 1991). Mecanismo similar parece explicar o maior teor total de Ca em frutos de macieiras pulverizadas com ProCa PF, comparativamente ao tratamento GA₄₊₇ PF. Adicionalmente, houve uma redução no número de elementos de vasos de xilema coloridos na região distal dos frutos, entre 81 e 125 DAPF (Figura 2), sugerindo um menor aporte de Ca aos frutos a partir deste período. Todavia, por apresentar contínua síntese de parede celular, os vasos do floema podem permanecer funcionais na condução dos minerais K, Mg e N, contribuindo para o aumento na relação entre estes minerais com o Ca (TROMP, 1972). A aplicação exógena de GAs também pode aumentar a relação hormonal entre GAs/auxina, e induzir a diferenciação nos vasos do floema (ALONI et al., 1990), favorecendo o aporte dos elementos minerais N, K e Mg aos frutos. Desta forma, o GA₄₊₇ PF pode aumentar os teores de N, K e Mg, resultando nas maiores relações (Mg+K)/Ca e (K+Mg+N)/Ca na região distal dos frutos, em relação ao ProCa PF.

Os teores totais de Ca e as relações com os minerais N, Mg e K não diferiram entre o controle e os tratamentos em PC

(Tabela 3). Os tratamentos GA₄₊₇ PC e ProCa PC (iniciando 125 DAPF) também não influenciaram no crescimento vegetativo das plantas e no tamanho dos frutos, comparado ao controle (Tabela 2). Além disso, a partir de 125 DAPF, a funcionalidade do xilema na região distal dos frutos foi reduzida, considerando o número de elementos de vaso do sistema cortical primário coloridos (Figura 2). Portanto, os tratamentos em PC (iniciando 125 DAPF) se tornam pouco expressivos na modificação da funcionalidade do xilema e da composição mineral total de Ca nos frutos. Possivelmente, estas características contribuíram para a similaridade entre o controle e os tratamentos em PC, para a composição mineral total de Ca e as suas relações com N, Mg e K nos frutos.

Tabela 3- Teor total de Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca) e relações minerais de N/Ca, Mg/Ca, K/Ca, (Mg+K/Ca) e (Mg+K+N)/Ca, no tecido polpa na região distal, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).

Tratamentos	Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	-----Relações minerais-----				
		N/Ca	Mg/Ca	K/Ca	$\frac{\text{Mg+K}}{\text{Ca}}$	$\frac{\text{Mg+K+N}}{\text{Ca}}$
Controle	180 ab	16,2 a	1,87 a	40,0 a	41,6 ab	55,1 ab
GA ₄₊₇ (PF)	155 b	20,6 a	2,18 a	50,9 a	52,8 a	73,9 a
ProCa (PF)	262 a	10,1 a	1,29 a	29,9 a	31,1 b	41,2 b
GA ₄₊₇ (PC)	205 ab	12,6 a	1,58 a	38,3 a	41,2 ab	53,1 ab
ProCa (PC)	230 ab	10,9 a	1,46 a	36,9 a	38,4 ab	49,2 ab
CV (%)	14,4	19,6	9,12	29,9	16,4	23,2

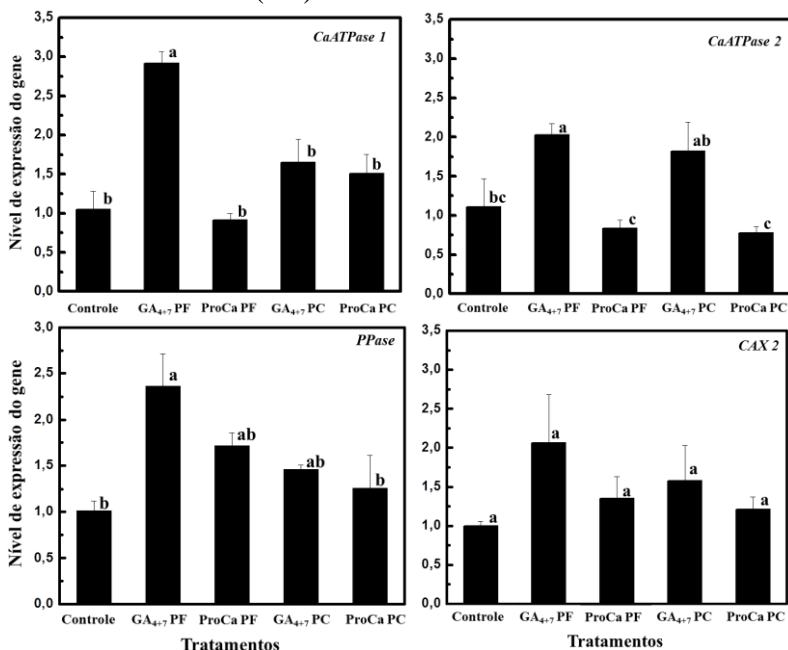
Fonte: produção do próprio autor. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

1.4.5 Atividade da PME e nível de expressão dos genes que codificam para transportadores de Ca e bombas eletrogênicas no tonoplasto

A atividade da PME e expressão dos genes de *CAX₃*, *CAX₆* e *V-ATPase* não diferiram entre os tratamentos (dados não apresentados). Os frutos de plantas pulverizadas com *GA₄₊₇* PF tiveram maior expressão da *Ca-ATPase1* e *H⁺-PPase*, comparativamente ao controle (Figura 3). Independente da época de aplicação dos tratamentos, os frutos submetidos ao *GA₄₊₇* indicaram maior expressão da *Ca-ATPase2*, em relação ao ProCa, mas sem diferir do tratamento-controle (Figura 3).

A aplicação de GAs durante o desenvolvimento dos frutos, também aumentou a expressão da *Ca-ATPase* e *H⁺-PPase* em tomates (FREITAS et al., 2012a). A maior expressão destes transportadores pode favorecer o bombeamento do Ca para o interior do vacúolo dos frutos (FREITAS et al., 2010). Nesta organela, o Ca fica complexado com fenóis, oxalatos e fosfatos (WHITE; BROADLEY, 2003), reduzindo o Ca livre na região do apoplasto, necessário para a estruturação e manutenção da integridade da membrana plasmática (MP) (MARSCHNER, 2012). Segundo Freitas et al. (2010), o decréscimo na concentração do Ca livre no apoplasto implica no aumento da permeabilidade da MP e maior probabilidade de ocorrência de BP nos frutos.

Figura 3- Nível de expressão dos genes de *Ca-ATPase1*, *Ca-ATPase2*, *H⁺-PPase* e *CAX 2* na polpa, região distal, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).



Fonte: produção do próprio autor. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

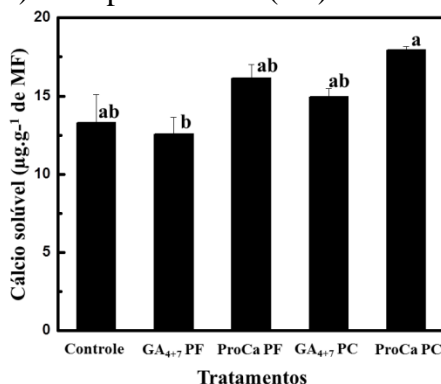
1.4.6 Cálcio solúvel total e extravasamento de eletrólitos

Não houve diferença na porcentagem de eletrólitos extravasados e no conteúdo de Ca solúvel total entre o controle e os demais tratamentos no momento da colheita (Tabela 4, Figura 4). Quando analisadas isoladamente as épocas de aplicação dos tratamentos, também não foi constatado diferença para estes mesmos atributos entre o GA₄₊₇ e o ProCa. Porém, a porcentagem de eletrólitos extravasados foi maior e o

teor de Ca solúvel total foi menor nos frutos submetidos ao GA₄₊₇ PF, comparativamente ao ProCa PC.

Njoroge et al. (1998) observaram que o aumento no conteúdo de Ca solúvel total reduz a porcentagem de eletrólitos extravasados em frutos de tomate. Comportamento similar foi observado nos frutos submetidos ao tratamento ProCa PC, em detrimento ao GA₄₊₇ PF, mas sem diferir dos demais tratamentos. Possivelmente, o menor conteúdo de Ca associado à MP nos frutos do tratamento GA₄₊₇ PF, proporcionou a redução na integridade de MP e o incremento na sua permeabilidade, comparativamente ao ProCa PC.

Figura 4- Teor de Ca solúvel total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca, MF) na polpa, região distal, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).



Fonte: produção do próprio autor. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4- Extravasamento de eletrólitos na polpa, região distal, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).

Tratamentos	Eletrólitos extravasados (%)
Controle	33,9 ab
GA ₄₊₇ (PF)	39,7 a
ProCa (PF)	31,4 ab
GA ₄₊₇ (PC)	32,6 ab
ProCa (PC)	28,9 b
CV (%)	8,73

Fonte: produção do próprio autor. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

1.4.7 Manifestação de “bitter pit”, rachaduras e podridões nos frutos

Quando analisadas isoladamente as épocas de pulverização dos tratamentos, pode-se observar que os frutos de plantas tratadas com GA₄₊₇ apresentaram maior incidência de BP, comparativamente ao ProCa, mas sem diferir do tratamento-controle (Figura 5).

A redução no conteúdo total de Ca e o aumento nas relações minerais (Mg+K)/Ca, (Mg+K+N)/Ca podem predispor a incidência de BP nos frutos submetidos ao GA₄₊₇ PF, comparado ao ProCa PF. Segundo Marschner (2012), ao formar ligações com o íon fosfato e/ou grupos carboxílicos dos fosfolipídeos e proteínas, o Ca desempenha um papel fundamental na estabilização da MP e integridade celular. Todavia, os elementos minerais Mg e K competem pelos mesmos sítios de ligação com o Ca na MP, não desempenhando a mesma função (FREITAS et al., 2010). O incremento destes minerais pode influenciar de forma negativa na manutenção da integridade da MP, predispondo o

extravasamento do líquido celular e o desenvolvimento do BP nos frutos (FREITAS et al., 2010).

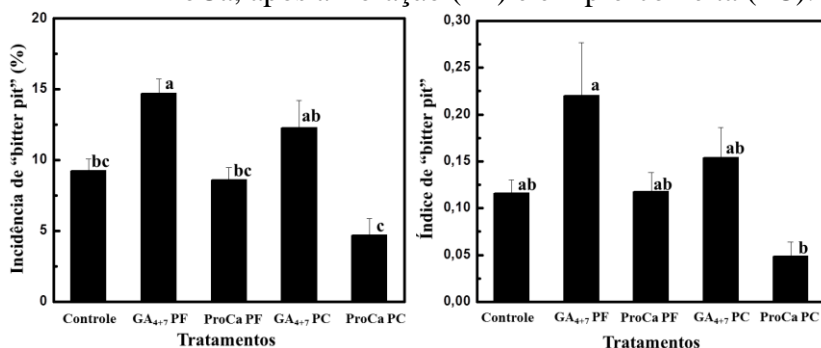
A manifestação de BP não se deve apenas ao conteúdo total de minerais nos frutos, mas também à homeostase de Ca a nível celular (FREITAS et al., 2010). Possivelmente, a maior expressão dos genes que codificam para a *Ca-ATPase* contribuiu para o aumento da incidência de BP nos frutos do tratamento GA₄₊₇, comparado ao ProCa, quando estes foram pulverizados nas mesmas épocas. A utilização do GA₄₊₇ também proporcionou o aumento na manifestação da podridão apical, distúrbio associado à deficiência de cálcio em tomates, devido a maior expressão dos genes que codificam a *Ca-ATPase* (FREITAS et al., 2012a). Isto colabora para a redução do Ca livre na região do apoplasto, através do transporte deste mineral para o vacúolo. Assim, o GA₄₊₇ pode reduzir o conteúdo de Ca solúvel apoplástico e comprometer a integridade da membrana plasmática (FREITAS et al., 2012a), predispondo a manifestação do distúrbio fisiológico associado a deficiência de Ca. Este mesmo mecanismo pode explicar a maior manifestação de BP em maçãs submetidas aos tratamentos GA₄₊₇, comparativamente ao ProCa, quando pulverizados nas mesmas épocas.

O tratamento GA₄₊₇ PF aumentou a incidência de BP nos frutos, em relação ao controle (Figura 5). O índice de BP também foi maior nos frutos tratados com GA₄₊₇ PF, comparativamente ao ProCa PC (Figura 5).

Segundo SAURE (2014) a manifestação de distúrbios fisiológicos pode estar vinculada aos níveis de espécies reativas ao oxigênio (ERO) nos frutos. Possivelmente, as GAs promovem a morte celular e a manifestação da podridão apical em tomate por meio da regulação na atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido desmutases, catalases e ascorbato peroxidases, tornando as células suscetíveis aos danos oxidativos e, conseqüentemente, à morte celular

(SAURE, 2014). Além disso, os níveis de GAs ativas promovem a degradação da proteína inibidora do crescimento (DELLA). Esta proteína é responsável pela manutenção dos baixos índices das ERO sob condições de estresse ambiental, atrasando a morte celular e promovendo a tolerância da mesma às condições adversas (SAURE, 2014). Portanto, além do conteúdo de Ca, a utilização do hormônio GAs em PF pode aumentar os níveis de ERO e, conseqüentemente, predispor a manifestação de BP nos frutos.

Figura 5- Incidência e índice de “bitter pit” em maçãs ‘Braeburn’, após dois meses de armazenamento e cinco dias a exposição ambiente, colhidas de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).



Fonte: produção do próprio autor. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A incidência de rachaduras foi maior nos frutos submetidos ao tratamento GA₄₊₇ PF, em relação aos demais tratamentos (Figura 6). A manifestação de rachaduras nos frutos pode ser decorrente da incapacidade das células do pericarpo em acompanhar a expansão das células do mesocarpo, devido da ação das expansinas. Em maçãs, os sintomas deste distúrbio fisiológico coincidiram com o aumento na expressão das expansina no tecido do mesocarpo

nos frutos, em detrimento ao pericarpo (KASAI et al., 2008). Segundo Peet (1992), outras características também podem tornar os frutos mais suscetíveis às rachaduras, como baixa resistência à ruptura e/ou extensibilidade da epiderme em estádios avançados de maturação, espessura da epiderme e tamanho dos frutos.

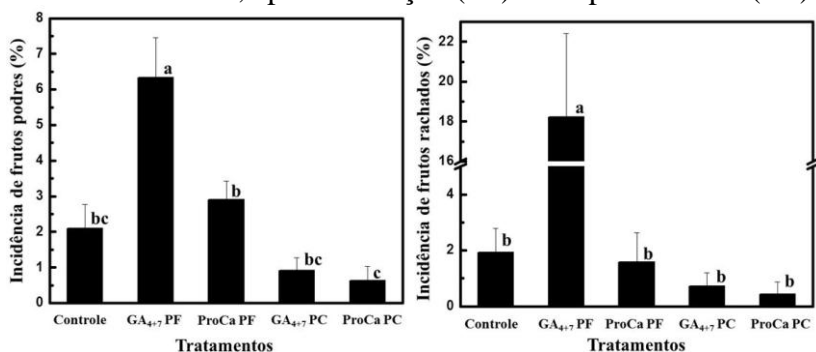
Nossos resultados mostram que a manifestação de rachadura aumenta com aplicação exógena de GAs, possivelmente devido ao maior do comprimento dos frutos (Figura 1). Existe uma alta correlação entre o aumento no volume dos frutos e a expansão das células do tecido do mesocarpo em maçãs (KASAI et al., 2008). O uso das GAs promove a expressão da xiloglucano endotransglicosilase (XET), enzima que atua aumentando a viscosidade da parede celular em resposta ao enfraquecimento das cadeias de xiloglucano (ATKINSON et al., 2009; HAN et al., 2015), permitindo o processo de alongação celular em resposta ao turgor celular. Portanto, aplicações exógenas de GAs podem resultar em frutos com maior tamanho (comprimento), podendo predispor o desenvolvimento de rachadura nos frutos.

A porcentagem de frutos podres foi similar entre o controle e os tratamentos GA₄₊₇ PC, ProCa PF e ProCa PC (Figura 6). Os frutos submetidos ao GA₄₊₇ PF apresentaram maior porcentagem de podridões do que os demais tratamentos (Figura 6).

O aumento na incidência de rachaduras pode favorecer a manifestação de podridões nos frutos submetidos ao GA₄₊₇ PF. Para alguns fungos causadores de podridões em pós-colheita de maçãs, como o *Penicillium expansum* Link, a infecção pode ser facilitada a partir de tecidos danificados ou do rompimento das células na epiderme dos frutos (MIEDES; LORENCES, 2004). Desta forma, a rachadura formada no tecido da epiderme dos frutos pode torná-los mais suscetível ao desenvolvimento de podridões quando tratados com GA₄₊₇ PF.

A manifestação de rachaduras e podridões nos frutos também pode estar associada ao aumento na produção de etileno em frutos submetidos ao tratamento GA₄₊₇ PF (Figura 8, Capítulo 2). Segundo Majumder; Mazumdar (2002), a elevação na produção de etileno promove a atividade da enzima PG, diminuindo a consistência dos frutos. Silveira et al. (2014) observaram que o uso de GAs em pós-floração reduziu a força para ruptura da epiderme em maçãs. Possivelmente, em razão destas modificações na estrutura da parede celular, os frutos tornam-se mais vulneráveis a manifestação de rachaduras e ao ataque de patógenos.

Figura 6- Incidência de frutos podres e rachados em maçãs ‘Braeburn’, após dois meses de armazenamento e cinco dias a exposição ambiente, colhidas de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).



Fonte: produção do próprio autor. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

1.4.8 Considerações gerais

A pulverização de macieiras com GA₄₊₇ PF induz a manifestação de BP nos frutos. A maior expressão da *Ca-ATPase 1* e da *H⁺-PPase* contribuem para este resultado, possivelmente em resposta ao menor conteúdo de Ca solúvel

apoplástico. Porém, o aumento nos níveis de EROs em razão das GAs ativas também pode ter colaborado para o desenvolvimento de BP nos frutos. Sendo assim, faz-se necessário trabalhos futuros para averiguar o efeito das GAs sobre o conteúdo de Ca solúvel apoplástico e a produção de EROs em maçãs. Isto auxiliará no entendimento dos mecanismos envolvidos na manifestação de BP e distúrbios associados à deficiência de Ca em maçãs, bem como na obtenção de medidas eficientes de controle.

1.5 CONCLUSÕES

A expressão da *Ca-ATPase 1* e *H⁺-PPase* e a incidência de “bitter pit” é maior em frutos de plantas pulverizadas com GA₄₊₇ pós-floração, em relação ao tratamento-controle.

Comparando as mesmas épocas de aplicação dos tratamentos, a expressão da *Ca-ATPase 2* e a incidência de “bitter pit” é menor em maçãs submetidas ao tratamento ProCa do que ao GA₄₊₇, mas sem diferir do controle.

A pulverização de macieiras com GA₄₊₇ pós-floração induz a manifestação de rachaduras e podridões nos frutos.

O conteúdo total de Ca é maior e as relações (Mg+K)/Ca e (K+Mg+N)/Ca menores em frutos de plantas tratadas com ProCa do que o GA₄₊₇, quando aplicados em pós-floração.

2 MATURAÇÃO E QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE MACIEIRAS PULVERIZADAS COM GA₄₊₇ E PROEXADIONA-CÁLCIO EM PÓS-FLORAÇÃO E PRÉ-COLHEITA

2.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da pulverização de macieiras em pós-floração (PF; uma pulverização a cada semana totalizando seis aplicações, iniciando 15 DAPF) e em pré-colheita (PC; uma pulverização a cada semana totalizando quatro aplicações, iniciando 5 semanas antes da colheita) com um inibidor da síntese de giberelinas, o proexadiona-cálcio (ProCa; 300 mg L⁻¹), e com GA₄₊₇ (300 mg L⁻¹), sobre a taxa respiratória e produção de etileno, a maturação e a qualidade dos frutos na colheita e após o armazenamento. As plantas do tratamento-controle foram pulverizadas com água. O experimento foi conduzido em um pomar comercial de macieiras 'Braeburn', no município de Elk Grove, Califórnia, EUA, localidade de Clarksburg, em 2013. Na maturação comercial, foi realizada a colheita dos frutos e as avaliações de porcentagem de cor vermelha e atributos de cor da epiderme, diâmetro e comprimento, firmeza de polpa, acidez titulável (AT), sólidos solúveis (SS), teste de iodo-amido e taxas respiratórias e de produção de etileno. Outra parte dos frutos foi submetida às avaliações de firmeza de polpa, AT, SS e taxas respiratórias e de produção de etileno, após o armazenamento em câmara fria convencional por dois meses (0±0,5 °C e 90-95% UR), seguido de cinco dias a exposição ambiente (25±2,0 °C e 60-70% UR). O aumento nos valores de índice iodo-amido e taxa de produção de etileno, e a redução na AT e na firmeza de polpa foram observados em frutos do tratamento GA₄₊₇ PF, comparado aos demais tratamentos. A porcentagem de cor vermelha, os valores do índice iodo-amido e a taxa de produção de etileno foram menores nos frutos de plantas pulverizadas com ProCa PC, em

relação aos demais tratamentos. O tratamento ProCa PC manteve a AT e a firmeza de polpa dos frutos superiores, na colheita e após o período de armazenamento, em relação ao tratamento-controle. O ProCa PC atrasou a maturação dos frutos, porém comprometeu a coloração vermelha dos mesmos.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Acidez. Firmeza de polpa. Sólidos solúveis. Anti-giberelina. Taxa respiratória. Etileno.

2.2 INTRODUÇÃO

A qualidade pós-colheita é um importante fator para a aceitação dos frutos no mercado. Em cultivares de maçãs vermelhas, quanto maior a cobertura e a intensidade de cor vermelha na epiderme, maior é o valor pago pelos frutos (SAURE, 1990), pois os tornam mais atrativos aos consumidores. Ainda, os atributos de firmeza de polpa e teores de ácidos e açúcares são parâmetros indicativos da qualidade de maçãs. Assim, diversas alternativas empregadas na cultura da macieira podem melhorar a qualidade dos frutos em pós-colheita, como é o caso da utilização de giberelinas (GAs), reportado por outros autores em diversos tipos de frutos (BEN ARIE et al., 1996; AWAD; JADER, 2002; AMARANTE et al., 2005; STEFFENS et al., 2009). Porém, o efeito deste regulador de crescimento pode ser variável em função das diferentes doses e épocas de sua aplicação.

Em pré-colheita (PC), a pulverização de macieiras ‘Jonagold’ com o GA₄₊₇ (1000 mg L⁻¹, aos 90 e 60 dias antes da colheita - DAC) não alterou a firmeza de polpa dos frutos (AWAD; JADER, 2002). Porém, este tratamento aumentou os teores de sólidos solúveis (SS) dos frutos no momento da colheita (AWAD; JADER, 2002). Já os teores de SS, a acidez titulável (AT) e o índice de iodo-amido nos frutos na colheita

não foram alterados em macieiras ‘Jonagold’ tratadas com GA₃ (500 mg L⁻¹) aos 49, 42 e 35 DAC, mas houve redução no conteúdo de antocianinas e na cor vermelha dos frutos (AWAD; JADER, 2002).

O tratamento de macieiras com GA₃ (638 mg L⁻¹) em pós-floração (PF), reduziu a AT em maçãs ‘Catarina’ e aumentou o teor de SS em ‘Fuji’, no momento da colheita (SILVEIRA et al., 2014). Schmidt et al. (2008) observaram uma antecipação na maturação de maçãs ‘Honeycrisp’ com o aumento nas doses de GA₄₊₇ (200 a 600 mg L⁻¹) em PF, associado a maior degradação de amido e redução na AT e firmeza de polpa dos frutos. A redução no atributo de firmeza também foi observada em maçãs ‘Empire’ tratadas com GA₄₊₇ (150 mg L⁻¹) em PF (GREENE, 1989). Todavia, o aumento nas doses de GA₄₊₇ (300 a 1200 mg L⁻¹) em PF, não influenciou na degradação de amido, na firmeza de polpa e AT no momento da colheita em maçãs ‘Cameo’ (SCHMIDT et al., 2008). A pulverização de macieiras com GA₃ em PF também pode aumentar o crescimento vegetativo das plantas (SILVEIRA et al., 2012), condição que pode reduzir a exposição dos frutos à luminosidade e comprometer o desenvolvimento da cor vermelha na epiderme das maçãs.

O manejo no crescimento vegetativo pode ser uma alternativa para aumentar a incidência de luminosidade no interior do dossel das plantas, condição que pode melhorar alguns atributos de qualidade em maçãs, como o desenvolvimento da coloração vermelha dos frutos (MEDJDOUB et al., 2005). O composto proexadiona-cálcio (ProCa) é uma alternativa para auxiliar na redução do vigor vegetativo de macieira (CLINE et al., 2008; HAWERROTH et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012). O ProCa apresenta estrutura similar ao ácido 2-oxoglutárico, sendo co-substrato para dioxigenases, catalisando hidroxilações que ocorrem no estágio final da biossíntese de GAs (EVANS et al., 1999). Assim, o ProCa atua impedindo a formação de GAs ativas, através do

bloqueio da ação das enzimas dioxigenases envolvidas na biossíntese de GAs (GA_{20} -oxidase e GA_3 -oxidase) (DAVIES, 2004).

Além de conter o desenvolvimento vegetativo das plantas, o ProCa PF também pode melhorar alguns atributos de qualidade dos frutos. A firmeza de polpa foi superior em maçãs ‘McIntosh’ (GREENE, 1999) e ‘Fuji’ (SILVEIRA et al., 2014) submetidas ao tratamento com ProCa em PF. Medjdoub et al. (2004) observaram uma redução no teor de SS em maçãs ‘Smoothie Golden Delicious’, com o aumento nas doses de ProCa (200 a 400 mg L⁻¹) em PF. Porém, este mesmo atributo não foi alterado em maçãs ‘Imperial Gala’ e ‘Fuji Suprema’ (HAWERROTH, 2010), ‘Golden Delicious’ (SPINELLI et al., 2010), ‘Fuji’ e ‘Catarina’ (SILVEIRA et al., 2014), de plantas tratadas com ao ProCa em PF. Este tratamento também promoveu o desenvolvimento de cor vermelha em maçãs ‘Catarina’ (SILVEIRA et al., 2014) e ‘Fuji’ (MEDJDOUB et al., 2005). Todavia, segundo Cline et al. (2008), o ProCa (375 mg L⁻¹) em PF comprometeu a porcentagem de cor vermelha em maçãs ‘Royal Court’. A utilização do ProCa (250 g ha⁻¹) em PC também reduziu o desenvolvimento da cor vermelha em maçãs ‘Braeburn’ (BIZJAK et al., 2012). Porém, não é conhecido o efeito deste composto aplicado em PC, sobre os demais atributos de qualidade dos frutos em macieiras. Grossmann (1992) observou o efeito do ProCa na redução nos níveis de etileno de células em suspensão de girassol e em discos foliares de trigo, mas este efeito não tem sido investigado em maçãs. Portanto, estas informações são importantes para o conhecimento dos demais benefícios deste composto à cultura da macieira.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da pulverização com ProCa e GA_{4+7} , em pós-floração e em pré-colheita, sobre a taxa respiratória e produção de etileno,

maturação e qualidade de maçãs ‘Braeburn’, na colheita e após o armazenamento.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em um pomar comercial de macieiras ‘Braeburn’ com 10 anos de idade, conduzidas com líder central, em sistema de média densidade, com espaçamento de 2,0 m × 6,0 m, localizado no município de Clarksburg, Califórnia, EUA (38°21’23,27’’N, 121°32’13,62’’O e altitude de 123 m). No pomar tinha um sistema de irrigação por aspersão e as plantas foram irrigadas de maio até agosto de 2013, durante a realização do experimento. O raleio manual dos frutos foi realizado, deixando dois frutos por cacho floral, como forma de manter a uniformidade de carga de frutos por macieiras entre os tratamentos. As médias mensais das temperaturas máximas e mínimas e a precipitação pluvial mensal, observadas ao longo da execução do experimento, encontram-se na Tabela 1 (Capítulo 1).

As plantas foram pulverizadas com água (tratamento controle), GA₄₊₇ e ProCa (ambos os produtos na dose de 300 mg L⁻¹) após a floração (AF) e em pré-colheita (PC). As aplicações AF iniciaram no dia 15/04/2013, 15 dias após a plena floração (DAPF), sendo repetidas a cada semana até completar seis aplicações. Já as aplicações PC iniciaram dia 05/08/2013 (125 DAPF), cinco semanas antes da colheita comercial (04/09/2013), sendo repetidas a cada semana até completar quatro aplicações. O volume de calda utilizado foi de 1.000 L.ha⁻¹, permitindo o completo molhamento do dossel foliar das plantas. Não foi utilizado espalhante adesivo junto aos tratamentos. Como fonte de proexadione-cálcio foi utilizado o produto comercial Apogee[®] (contendo 27,5% de ingrediente ativo) e de giberelina o Typrus[®] (contendo 2,0% de ingrediente ativo).

Na maturação comercial (160 DAPF) foi realizada a colheita dos frutos, os quais foram separados em amostras contendo aproximadamente 50 frutos por unidade amostral. Uma subamostra de 25 frutos por unidade amostral foi submetida às análises de percentagem de cor vermelha, atributos de cor da epiderme, firmeza de polpa, acidez titulável (AT), sólidos solúveis (SS), teste de iodo-amido e taxas respiratórias e de produção de etileno. Outra subamostra de 25 frutos por unidade amostral foi armazenada em câmara fria convencional por dois meses ($0\pm 0,5$ °C e 90-95% UR), seguido de cinco dias a exposição ambiente ($25\pm 2,0$ °C e 60-70% UR), e após este período, submetidas às avaliações de firmeza de polpa, AT, SS e taxas respiratórias e de produção de etileno.

A porcentagem de cor vermelha foi determinada por meio de análise subjetiva da superfície dos frutos recoberta com cor vermelha. A determinação da cor da epiderme foi efetuada com colorímetro Minolta, modelo CR 400, sendo as leituras realizadas nas regiões mais e menos vermelhas do fruto, correspondendo às regiões mais e menos expostas à radiação, respectivamente, e os resultados expressos nos atributos L e h° . O h° (ângulo *hue*) define a coloração básica, sendo que 0° = vermelho, 90° = amarelo e 180° = verde. O L (*lightness*) define a luminosidade, que varia de zero (preto) a 100 (branco).

A firmeza de polpa (N) foi determinada com o auxílio de um penetrômetro (Guss, Strand, Western Cape, África do Sul), equipado com ponteira de 11 mm de diâmetro, em duas regiões opostas, na porção equatorial dos frutos, após remoção da epiderme.

A AT (% de ácido málico) foi determinada em uma amostra de 4 mL de suco dos frutos, extraído com um processador manual. A titulação foi com o auxílio de um

titulador automático (Radiometer, Copenhagen, Denmark) em solução de NaOH 0,1 N, até obter o pH 8,2.

Os teores de SS (°Brix) foram determinados com refratômetro digital, modelo PR201 α (Atago, Tóquio, Japão), utilizando-se do suco extraído conforme descrito para AT.

O teste de iodo-amido foi determinado por meio da comparação do escurecimento da metade peduncular dos frutos tratada com solução de iodo, em uma escala de 1 a 5, em que o índice 1 indica o teor máximo de amido e o índice 5 representa o amido totalmente hidrolisado.

As taxas respiratórias ($\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e de produção de etileno ($\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foram quantificadas, colocando seis frutos de cada amostra em um recipiente com o volume de 3.7860mL, que permite fechamento hermético. A respiração e produção de etileno foram obtidas pela diferença da concentração de CO_2 e etileno, respectivamente, no interior do recipiente, imediatamente após o seu fechamento e depois de uma hora. O CO_2 foi determinado com o auxílio de um analisador de gás (VIA510; Horiba, Fukuoka, Japão) e o etileno com um cromatógrafo a gás (Model 211 Series S; Hach-Carle Co., Fullerton, CA) utilizando duas colunas (1,22 m and 0,305 m, 8% NaCl em Alumina F-1 80/100 DV; Chandler pítiEngineering–Carle Chromatography, Tulsa, OK). As temperaturas da coluna, do detector e do injetor foram de 80°C. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste, em um fluxo de 30 mL.min^{-1} .

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, contendo cinco tratamentos e seis blocos, sendo cada unidade amostral constituída de uma planta. Os dados obtidos nos diferentes tratamentos foram inicialmente submetidos ao teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) para verificar a homogeneidade das variâncias, e ao teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), para verificar a normalidade dos resíduos. Apenas os dados de porcentagem de cor vermelha não atenderam aos pressupostos de homogeneidade das

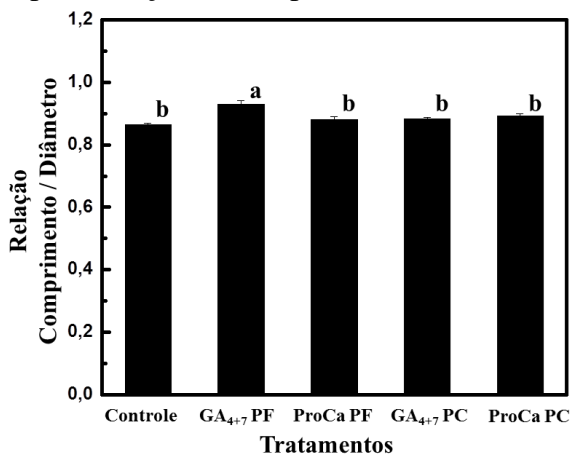
variâncias e normalidade dos resíduos, sendo necessário a sua transformação em arco seno $[(x+5)/100]^{1/2}$ antes de serem submetidos à ANOVA. As médias de tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2002).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 *Relação comprimento/diâmetro (C/D) dos frutos*

Não foi observado diferença para a relação C/D entre os frutos do controle e os tratamentos ProCa PF, GA₄₊₇ PC e ProCa PC (Figura 7). Porém, os frutos de plantas tratadas com GA₄₊₇ PF apresentaram maior relação C/D em comparação aos demais tratamentos (Figura 7). Este resultado indica uma modificação no formato dos frutos do tratamento com GA₄₊₇ PF. O aumento no crescimento do fruto no eixo longitudinal pode estar associado ao maior desenvolvimento do tecido cortical apical dos frutos, quando submetidos às GAs em PF. Em maçãs, este comportamento é decorrente de um aumento no tamanho das células da região apical, que é mais sensível as GAs, do que o tecido proximal dos frutos (NAKAGAWA et al., 1967). Portanto, nossos resultados mostram que as pulverizações com GA₄₊₇ PF (iniciando 15 DAPF), coincidindo com as fases de divisão e expansão celular, podem promover o maior comprimento dos frutos tornando-os com um formato mais alongado (maior relação C/D).

Figura 7- Relação comprimento/diâmetro em maçãs 'Braeburn' colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (AF) e pré-colheita (PC).



Fonte: Produção do próprio autor. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.4.2 Taxa respiratória e de produção de etileno dos frutos

No momento da colheita não foi observado diferença na taxa respiratória entre frutos do controle e dos demais tratamentos (Figura 8). Porém, neste mesmo período, a taxa respiratória dos frutos de plantas tratadas com GA₄₊₇ PF foi maior do que com ProCa PC (Figura 8).

Os frutos do tratamento GA₄₊₇ PF expressaram maior porcentagem de eletrólitos extravasados, em relação ao ProCa PC (Tabela 4, Capítulo 1), indicando uma maior permeabilidade de membrana dos frutos submetidos ao GA₄₊₇ PF. Esta condição pode induzir o aumento na atividade respiratória dos frutos (BAUR; WORKMAN, 1964; COOPER; BANGERTH, 1976) como forma de produção de energia (ATP), para reparar os possíveis danos existentes na membrana plasmática e restabelecer o equilíbrio celular (WANG et al.,

2013). Isto permite explicar o aumento na taxa respiratória em frutos tratados com GA₄₊₇ PF, comparado ao ProCa PC.

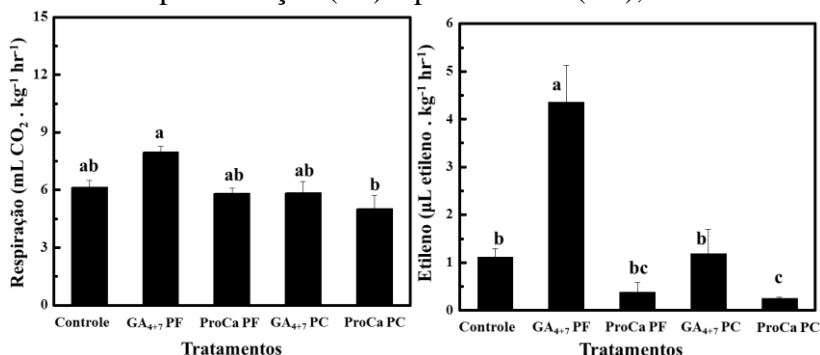
Os frutos de plantas submetidas ao tratamento GA₄₊₇ PF apresentaram a maior taxa de produção de etileno na colheita, em relação aos demais tratamentos (Figura 8). O GA₄₊₇ PF aumentou em 91,2% a taxa de produção de etileno, comparado ao ProCa PF (Figura 8).

Em frutos de plantas tratadas com GA₄₊₇ PF, foi observada a maior expressão da *Ca-ATPase1* e *Ca-ATPase2*, enzimas responsáveis pelo deslocamento do Ca para o interior do vacúolo, comparado ao ProCa PF (Figura 3, Capítulo 1). Esta condição pode alterar os teores de Ca livre a nível celular, podendo comprometer alguns processos fisiológicos nos frutos mediados pelo conteúdo de Ca solúvel, como a regulação na produção de etileno (NJOROGÉ et al., 1998). Por outro lado, o aumento na produção de etileno em frutos tratados com GAs em pós-floração também pode estar associado a maior atividade de enzimas envolvidas na biossíntese do etileno, como a *S-adenosilmetionina sintase* (LI et al., 2015). Desta forma, podendo explicar a maior produção de etileno na colheita em frutos submetidos ao tratamento GA₄₊₇ PF.

Os frutos de plantas tratadas com ProCa PC apresentaram menor taxa de produção de etileno na colheita, comparado aos demais tratamentos, sem diferir do ProCa PF (Figura 8). O ProCa PC reduziu em 82,9% e 84,8% a taxa de produção de etileno comparado ao controle e GA₄₊₇ PC, respectivamente. O efeito do ProCa PC em controlar a produção de etileno pode estar associado a sua similaridade estrutural com o ácido 2-oxoglutárico, interferindo na biossíntese desse hormônio (RADEMACHER, 2000). Segundo Min et al. (1996), o paclobutrazol, outro composto inibidor da síntese de GAs, também reduz a síntese do etileno através do bloqueio da *ACC oxidase*, interferindo na biossíntese do etileno a partir do ACC. A *ACC oxidase* é uma dioxigenases que

requer o ácido ascórbico como um co-substrato, e pode ter sua atividade inibida pelo ácido 2-oxoglutárico e compostos de estrutura similar (BUENO et al., 1996), como o ProCa.

Figura 8- Respiração e produção de etileno em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (PF) e pré-colheita (PC), na colheita.



Fonte: Produção do próprio autor. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.4.3 Desenvolvimento da cor dos frutos

Não foi observada diferença na porcentagem de cor vermelha dos frutos submetidos aos tratamentos controle e ProCa PF (Tabela 5). Todavia, o tratamento ProCa PF resultou em valores de ângulo h° na região dos frutos mais exposta a luminosidade, superiores ao controle (Tabela 5), indicando menor desenvolvimento da cor vermelha.

Os frutos de plantas pulverizadas com ProCa PC apresentaram uma menor porcentagem de cor vermelha, comparado aos demais tratamentos (Tabela 5; Figura 9). Em relação ao controle, o ProCa PC reduziu 51,2% da porcentagem de cor vermelha (Tabela 5). Para a exportação de maçãs ‘Braeburn’ da Nova Zelândia é requerido uma condição mínima de 40% de cobertura vermelha na epiderme dos frutos

(KUPFERMAN, 1994), podendo comprometer a utilização do ProCa PC. Além disso, o ProCa PC reduziu a intensidade da cor vermelha na porção do fruto mais exposta a luminosidade, caracterizado pelos maiores valores de L e h° (Tabela 5).

A pulverização do ProCa (250 g ha⁻¹), três semanas antes da colheita comercial, diminuiu o desenvolvimento da cor vermelha em maçãs 'Braeburn' cultivadas na Eslovênia (BIZJAK et al., 2012). Este resultado está relacionado à redução no teor de antocianinas nos frutos submetidos ao ProCa em pré-colheita, como resposta a menor atividade da flavanona 3 β -hidroxilase (BIZJAK et al., 2012), uma dioxigenase dependente de 2-oxoglutarato, envolvida na biossíntese das antocianinas e de outros flavonoides. Isto se deve à similaridade entre as estruturas moleculares do ProCa e do 2-oxoglutarato (EVANS et al., 1999), proporcionando a inibição de reações catalisadas por dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato (HALBWIRTH et al., 2006). De forma similar, a utilização do ProCa em pós-floração e em pré-colheita pode ter comprometido o desenvolvimento de cor vermelha nos frutos, em relação ao tratamento-controle. Adicionalmente, o ProCa PC também reduziu a produção de etileno em maçãs no momento da colheita, comparativamente aos frutos do controle (Figura 8). O etileno pode estimular a síntese de pigmentos e a degradação da clorofila na epiderme de maçãs, proporcionando o acúmulo de antocianinas e o desenvolvimento da cor vermelha nos frutos (FARAGHER e BROHIER, 1984). A redução no acúmulo de antocianinas e a manutenção no conteúdo de clorofila em resposta à menor produção de etileno também pode ter contribuído para a diminuição do desenvolvimento de cor em maçãs submetidas ao ProCa PC, comparado ao controle.

Tabela 5- Cor vermelha (%) e atributos de cor (L e h°) na epiderme de maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita (PC).

Tratamentos	Cor vermelha (%)	Atributos de cor			
		-----Região dos frutos-----			
		Mais vermelha		Menos vermelha	
		L	h°	L	h°
Controle	50,6a	49,8c	49,0c	71,7ab	110,2b
GA ₄₊₇ PF	54,0a	51,0bc	49,2c	72,7a	106,3c
ProCa PF	53,1a	53,1bc	64,1b	69,1c	112,1ab
GA ₄₊₇ PC	53,9a	53,7b	59,4b	70,9b	111,1ab
ProCa PC	24,7b	58,6a	77,1a	69,2c	112,2a
CV (%)	25,8	6,35	18,7	2,23	2,12

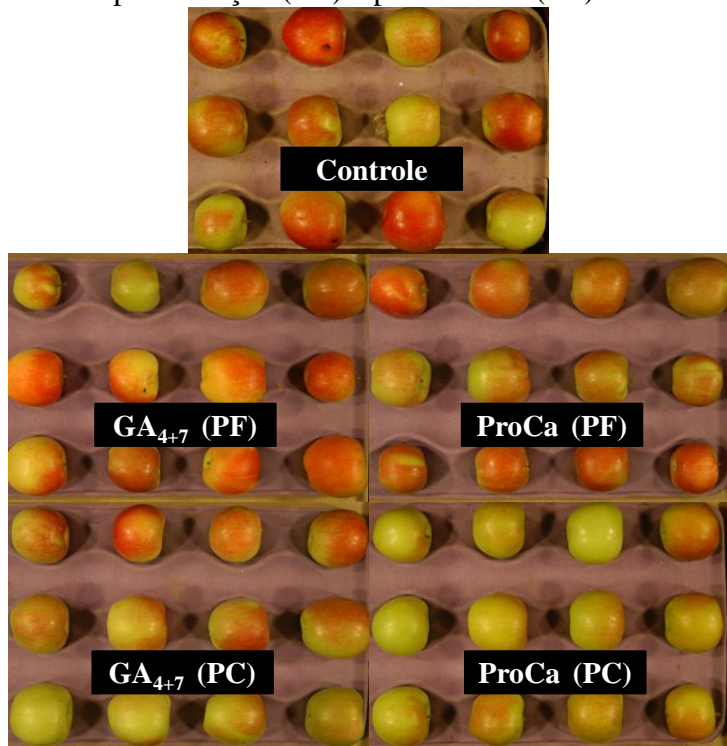
Fonte: Produção do próprio autor. Média seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A aplicação GA₄₊₇ PC diminuiu o desenvolvimento da cor vermelha na porção do fruto mais exposta a luminosidade (maior valor de h°), em relação ao controle (Tabela 5). Awad & Jader (2002) observaram uma redução no acúmulo de antocianinas e na porcentagem de cor vermelha em maçãs ‘Jonagold’ pulverizadas com GA₃ (500 mg L⁻¹) em pré-colheita (aos 49, 42 e 35 DAC), sem alterar a maturação dos frutos. Segundo Martínez et al. (1996), quando aplicado sobre a epiderme dos frutos, o GA₃ interferiu na síntese de antocianinas, inibindo ou retardando o aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase, comprometendo o desenvolvimento da cor vermelha em morangos. De forma similar, o GA₄₊₇ PC pode ter reduzido o acúmulo de antocianinas e o desenvolvimento da cor vermelha em maçãs.

Na porção do fruto menos exposta a luminosidade, os tratamentos ProCa PF e PC reduziram os valores de L (Tabela 5). O mesmo foi observado em maçãs ‘Fuji’ e ‘Catarina’ de

plantas pulverizadas com ProCa (319 mg L^{-1}) em pós-floração (30 e 50 DAPF) (SILVEIRA et al., 2014). Ainda, foi observado maior valor de h° nessa região dos frutos, menos exposta a luminosidade, mostrando uma coloração verde mais intensa em maçãs tratadas com ProCa PC, comparativamente ao tratamento-controle (Tabela 5). Este comportamento pode estar associado a menor produção de etileno nos frutos tratados com ProCa PC (Figura 8), reduzindo a atividade das enzimas clorofilases e peroxidases, que atuam na degradação de clorofilas (WHALE et al., 2007).

Figura 9- Coloração no lado mais vermelho em maçãs 'Braeburn' colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (AF) e pré-colheita (PC).



Fonte: Produção do próprio autor.

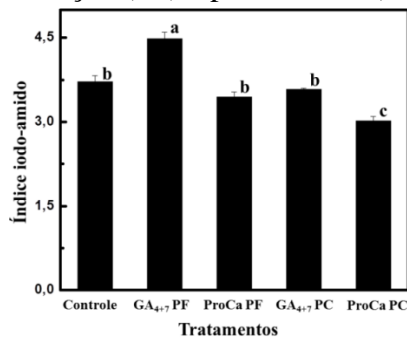
2.4.4 Índice iodo-amido dos frutos

Os valores de índice de iodo-amido foram similares entre os frutos do controle e os tratamentos ProCa PF e GA₄₊₇ PC (Figura 10). Pode-se verificar que os frutos de plantas pulverizadas com GA₄₊₇ apresentaram maiores valores de índice iodo-amido, em relação ao tratamento ProCa, quando analisadas isoladamente as épocas de aplicação destes compostos (Figura 10). Além disso, os frutos do tratamento ProCa PC apresentaram o menor valor de índice iodo-amido

(Figura 10). Possivelmente, estes resultados estão associados às maiores taxas de produção de etileno nos frutos submetidos ao GA_{4+7} em relação ao tratamento ProCa, e a menor na produção de etileno nos frutos do tratamento ProCa PC em comparação aos demais tratamentos (Figura 8).

O etileno proporciona o aumento na atividade da enzima α -amilase, resultando em uma redução substancial no conteúdo de amido dos frutos (PESIS et al., 1978). Desta forma, o GA_{4+7} pode proporcionar a maior degradação do amido (maior valor do índice iodo-amido), ao passo que o ProCa manteve o conteúdo de amido, principalmente quando aplicado em PC.

Figura 10- Índice iodo-amido na colheita, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA_{4+7} e ProCa, em pós-floração (PF) e pré-colheita (PC).



Fonte: Produção do próprio autor. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.4.5 Firmeza de polpa dos frutos

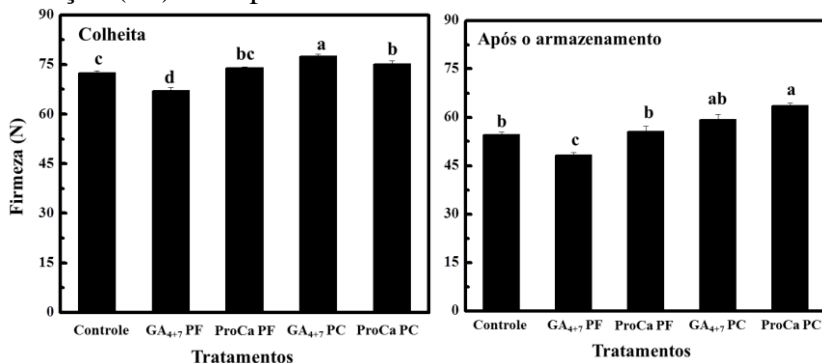
Os frutos de plantas pulverizadas com GA_{4+7} PF apresentaram menor firmeza de polpa na colheita e após o período de armazenamento, comparado aos demais tratamentos

(Figura 11). Este mesmo tratamento diminuiu os teores de Ca total nos frutos, em relação ao ProCa PF (Tabela 3, Capítulo 1). A maior parte do Ca total nos tecidos dos frutos está associada à parede celular, onde pode ligar-se de forma iônica a pectina insolúvel formando pectato de Ca, sendo essencial na manutenção da integridade da parede celular (MARSCHNER, 2012) e da coesão existente entre as células (GLENN; POOVAIAH, 1987). Desta forma, o Ca pode desempenhar seu papel na estrutura celular contribuindo para o aumento na rigidez dos tecidos da polpa dos frutos (GLENN; POOVAIAH, 1987). Isto justifica a correlação positiva entre o conteúdo de Ca total nos tecidos cortical dos frutos com a firmeza de polpa em maçãs (BEAVERS et al., 1994). Portanto, a menor firmeza de polpa em maçãs do tratamento GA₄₊₇ PF pode ser resultado da redução no conteúdo de Ca total, em relação ao tratamento ProCa PF. Nos frutos de plantas pulverizadas com GA₄₊₇ PF também foi observado maior produção de etileno no momento da colheita, comparado aos demais tratamentos (Figura 8). Existe uma relação entre a produção de etileno nos frutos e a atividade da poligalacturonase (PG), enzimas responsáveis pela redução da firmeza dos frutos (MAJUMDER; MAZUMDAR, 2002). Isto pode explicar a menor consistência da polpa dos frutos quando exposto ao etileno (SALTVEIT, 1999). Desta forma, a elevação na produção de etileno na colheita no tratamento GA₄₊₇ PF possivelmente colaborou para a menor consistência de polpa dos frutos neste período, e esta característica se manteve mesmo após o período de armazenamento.

Os frutos submetidos ao tratamento GA₄₊₇ PC apresentaram a maior firmeza de polpa na colheita (77,4 N), comparado aos demais tratamentos (Figura 11). O ProCa PC apresentou valores intermediários de firmeza de polpa dos frutos na colheita, sendo superior ao controle, mesmo após o período de armazenamento (Figura 11).

O efeito das GAs em pré-colheita na manutenção na firmeza de polpa tem sido observado em pêssego (AMARANTE et al., 2005), ameixa (STEFFENS et al., 2009) e caqui (BEN ARIE et al., 1996). Em caquis tratados com GA₃ (50 mg L⁻¹) em pré-colheita, Ben Arie et al. (1996) verificaram um aumento de 37% no conteúdo de celulose da parede celular dos frutos, proporcionando a sua maior firmeza no momento da colheita. Segundo estes autores, o comportamento pode ser consequência da inibição ou redução na atividade da endo-β-1,4-glucanase em frutos submetidos ao tratamento pré-colheita com GA₃. De forma similar, o GA₄₊₇ PC pode ter contribuído para a maior consistência da polpa em maçãs no momento da colheita. Todavia, este comportamento não se manteve após o armazenamento, sendo observada uma redução de 23% na firmeza de polpa dos frutos submetidos ao GA₄₊₇ PC, enquanto que o tratamento ProCa PC proporcionou uma redução de 16% após o mesmo período. Possivelmente, a manutenção da firmeza de polpa dos frutos na colheita superior ao controle esteja associada ao efeito do ProCa PC em reduzir a produção de etileno neste período (Figura 8), condição que também pode ter favorecido para a manutenção da consistência da polpa, mesmo após o período de armazenamento.

Figura 11- Firmeza de polpa, na colheita e após o armazenamento, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas aos 160 DAPF, de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, após a floração (PF) e em pré-colheita.



Fonte: Produção do próprio autor. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.4.6 Sólidos solúveis (SS) e acidez titulável (AT) dos frutos

Os frutos de plantas tratadas com ProCa PC apresentaram menores teores de SS na colheita, comparado ao controle (Figura 12). Possivelmente, a menor produção de etileno na colheita em frutos do tratamento ProCa PC contribuiu para este resultado, em relação ao controle (Figura 8). A redução na síntese do etileno em pré-colheita permite o atraso na maturação em maçãs (BYERS, 1997; AMARANTE et al., 2002; GREENE, 2002), considerando a sua capacidade em desencadear diversos processos fisiológicos e bioquímicos ligados à maturação dos frutos (BRACKMANN, et al., 2010). Assim, a redução na hidrólise de amilopectinas e na degradação da protopectina, como resposta a menor produção de etileno, compromete o acúmulo de açúcares nos frutos culminado em menores teores de SS (SALTVEIT, 1999).

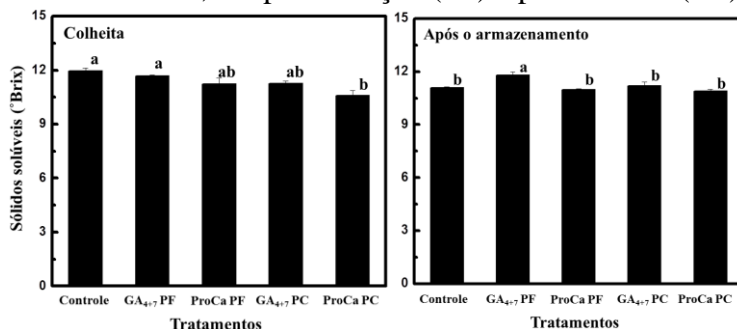
Os valores de AT foram superiores nos frutos do tratamento ProCa PC na colheita, em relação aos demais tratamentos (Figura 13). O GA₄₊₇ PF proporcionou a

diminuição nos níveis de AT dos frutos na colheita, mas sem diferir do tratamento-controle (Figura 13). As diferenças para a AT observadas neste trabalho podem ser decorrentes das taxas respiratórias dos frutos no momento colheita. De forma geral, os teores de ácidos orgânicos diminuem com a maturação dos frutos, devido à oxidação dos mesmos no ciclo dos ácidos tricarbóxicos, em consequência da atividade respiratória (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Sendo assim, o maior consumo de ácido málico pode ser resultado do aumento da taxa respiratória dos frutos submetidos ao GA₄₊₇ PF na colheita (menor AT), comparado ao ProCa PC.

Os frutos de plantas tratadas com GA₄₊₇ PF apresentaram maior teor de SS após 60 dias de armazenamento (Figura 12). Neste mesmo período, a menor firmeza de polpa também foi observada nos frutos submetidos GA₄₊₇ PF (Figura 11). Steffens et al. (2011) verificaram uma relação inversa entre os teores de SS e firmeza de polpa em ameixas 'Leatitia', após o período de armazenamento. Possivelmente, o aumento nos teores de SS e a redução na firmeza de polpa estão associados a maior produção de etileno nos frutos (SALTVEIT, 1999). Isto proporciona o incremento na atividade da poligalacturonase (PG) e na solubilização da pectina presente na parede celular no tecido dos frutos (KETSÁ; DAENGGANITB, 1999), resultando no aumento dos teores de SS dos mesmos.

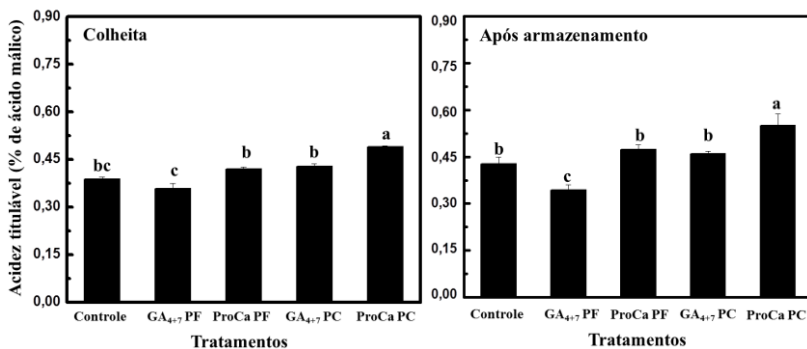
Após o período de 60 dias de armazenamento, os níveis de AT dos frutos submetidos ao ProCa PC foram superiores aos demais tratamentos, ao passo que o GA₄₊₇ PF se manteve inferior (Figura 13). Não houve diferença na taxa respiratória dos frutos após o período de armazenamento (dados não apresentados), contribuindo para a manutenção dos níveis de AT estáveis entre os tratamentos, sustentando-se as diferenças obtidas na colheita.

Figura 12- Teor de sólidos solúveis, na colheita e após o armazenamento, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (PF) e pré-colheita (PC).



Fonte: Produção do próprio autor. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 13- Acidez titulável, na colheita e após o armazenamento, em maçãs ‘Braeburn’ colhidas de plantas tratadas com água (controle), GA₄₊₇ e ProCa, em pós-floração (PF) e pré-colheita (PC).



Fonte: Produção do próprio autor. As barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.4.7 Considerações gerais

A pulverização de macieiras com ProCa em pré-colheita diminuiu a produção de etileno e retardou a maturação dos frutos. Este tratamento também comprometeu a coloração vermelha dos mesmos. Porém, o efeito do ProCa em pré-colheita sobre o desenvolvimento da cor vermelha pode ser minimizado atrasando a colheita dos frutos, mantendo-os por um período maior a exposição da luminosidade solar. A utilização do ProCa em pré-colheita também pode ser uma alternativa para cultivares de macieiras com frutos de coloração verde, como 'Granny Smith'. Todavia, deve-se estabelecer um manejo pós-colheita diferenciado aos frutos tratados com ProCa em pré-colheita, considerando o período de carência de 50 dias para este composto. Trabalhos futuros são necessários como forma de averiguar os efeitos de doses menores de ProCa aplicado em pré-colheita, sobre a qualidade dos frutos de diferentes cultivares de macieiras.

2.5 CONCLUSÕES

A taxa respiratória é maior nos frutos de macieiras pulverizadas com GA₄₊₇ em pós-floração, do que em relação ao ProCa em pré-colheita.

O tratamento GA₄₊₇ em pós-floração reduz a firmeza de polpa e aumenta os valores do índice iodo-amido e a taxa de produção de etileno em maçãs no momento da colheita.

A porcentagem e o desenvolvimento da cor vermelha, o índice de iodo-amido e a taxa de produção de etileno são menores, e os teores de sólidos solúveis e a firmeza de polpa são preservados na colheita, em maçãs de plantas tratadas com ProCa em pré-colheita.

Após o armazenamento, a firmeza de polpa e a acidez são menores e os teores de sólidos solúveis maiores em maçãs

submetidas ao tratamento GA₄₊₇ em pós-floração, comparado ao controle.

A firmeza de polpa e acidez são preservados em maçãs de plantas tratadas com ProCa em pré-colheita, mesmo após o período de armazenamento, quando comparado ao controle.

3 CRESCIMENTO VEGETATIVO DAS PLANTAS E MANIFESTAÇÃO DE DISTÚRBIOS FISIOLÓGICOS NOS FRUTOS EM MACIEIRAS TRADADAS COM GA₃ E DOSES CRESCENTES DE PROEXADIONA-CÁLCIO

3.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do ácido giberélico (GA₃; 330 mg L⁻¹) e de doses de proexadiona-cálcio (ProCa; 165, 330 e 495 mg L⁻¹), aplicados em macieiras ‘Fuji’ e ‘Gala’ em pós-floração, sobre o crescimento vegetativo das plantas, e a funcionalidade do xilema, a composição mineral no tecido da casca e polpa e a manifestação de distúrbios fisiológico nos frutos. As doses de ProCa e GA₃ foram divididas em três aplicações, sendo realizadas aos 30, 60 e 90 dias após a plena floração (DAPF). Plantas do tratamento-controle foram pulverizadas com água. O experimento foi conduzido em um pomar localizado no município de São Joaquim- SC, nas safras de 2011-2012 e 2012-2013. Para a funcionalidade do xilema foram coletados frutos aos 90, 129 e 150 DAPF, na safra 2011-2012. Na maturação comercial, foi realizada a colheita e a avaliação de análise mineral total de Ca e sua relação com Mg, K e N nos frutos. Após o armazenamento em atmosfera refrigerada por quatro meses (0±0,5 °C e 90-95% UR), seguido de cinco dias a exposição ambiente (25±2,0°C e 60-70% UR), os frutos foram submetidos as avaliações de manifestação do “bitter pit”, escaldadura, rachadura, degerescência distal e podridões. O aumento nas doses de ProCa promoveu, de forma linear, a redução no tamanho dos ramos do ano das plantas e no comprimento dos frutos, em ambas as cultivares. O tratamento GA₃ reduziu o número de elementos de vasos de xilema cortical primário coloridos, nas regiões proximal e distal, de maçãs ‘Gala’ aos 90 DAPF, comparado ao ProCa nas doses

330 e 495 mg L⁻¹. O aumento nas doses de ProCa diminuiu linearmente o conteúdo total de Ca no tecido polpa em maçãs ‘Fuji’ e no tecido casca em maçãs ‘Gala’. A incidência de “bitter pit” e escaldadura em maçãs ‘Fuji’ diminuiu linearmente com o aumento nas doses de ProCa. Em maçãs ‘Gala’, o tratamento das plantas com ProCa na dose 165 mg L⁻¹ reduziu a incidência de “bitter pit” e na dose de 495 mg L⁻¹ reduziu a incidência de rachaduras nos frutos, quando comparado ao tratamento com GA₃, sem, no entanto, diferir do tratamento-controle. A utilização do ProCa reduz o crescimento vegetativo das plantas de ambas as cultivares, e reduz o conteúdo total de Ca no tecido polpa, a manifestação de “bitter pit” e escaldadura em maçãs ‘Fuji’. Maçãs ‘Gala’ de plantas pulverizadas com GA₃ tendem apresentar maior manifestação de rachaduras, maior relação N/Ca no tecido polpa e menor funcionalidade do xilema no início do desenvolvimento dos frutos, em relação ao ProCa (495 mg L⁻¹).

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Anti-giberelina. Giberelina. Composição mineral. Distúrbio fisiológico.

3.2 INTRODUÇÃO

A perda de frutos em pós-colheita ainda é elevada nos dias atuais. Na cultura da macieira este problema é em parte decorrente da exteriorização de distúrbios fisiológicos nos frutos, como o “bitter pit” (BP) (AMARANTE et al., 2011). O BP caracteriza-se inicialmente como uma discreta mancha na polpa, de coloração escura, que se torna desidratada com o tempo, ocasionando pequenas depressões na epiderme do fruto (FERGUSON & WATKINS, 1989), tornando-o impróprio para a comercialização.

A manifestação deste distúrbio fisiológico está relacionada ao baixo conteúdo de cálcio (Ca) em maçãs (AMARANTE et al., 2011), e sua ocorrência é intensificada

em condições de elevado níveis de magnésio (Mg), nitrogênio (N), e potássio (K) (AMARANTE et al., 2006). O surgimento do BP também pode estar associado ao incremento na atividade de giberelinas (GAs) nas plantas (SAURE, 2005).

A aplicação de GAs promove o crescimento vegetativo em macieiras (SILVEIRA et al 2012), o que parece contribuir para a competição entre frutos e ramos (folhas e brotos) pelo conteúdo total de Ca disponível, reduzindo o aporte deste íon aos frutos (SAURE, 2005). As GAs também promovem a expansão nas células dos frutos (NAKAGAWA et al., 1967). Assim, o tratamento com GAs pode aumentar o tamanho dos frutos, diminuindo o conteúdo total de Ca em resposta a diluição deste elemento mineral (FERGUSON; WATKINS, 1992). Em maçãs, o incremento no tamanho dos frutos também pode comprometer a funcionalidade do xilema (MIQUELOTO et al., 2014), em consequência do colapso dos vasos do xilema localizados principalmente na região do pericarpo (DRAZETA et al., 2004). Segundo Ferguson & Watkins (1989), o Ca é transportado na planta exclusivamente via xilema. Assim, a redução na funcionalidade deste tecido condutor em plantas tratadas com GAs induz o menor aporte de Ca aos frutos, tornando-os vulneráveis ao BP (SAURE, 2005). Ainda, por apresentar contínua síntese de parede celular, os vasos do floema continuam ativos na condução dos minerais K, Mg e N, permitindo o acréscimo na relação entre estes minerais com o Ca (TROMP, 1972).

A utilização de compostos antagonistas às GAs, como o proexadiona-cálcio (ProCa), pode ser uma alternativa para controlar as perdas pós-colheita de frutos na cultura da macieira. O ProCa é um composto de estrutura similar ao ácido 2-oxoglutárico, sendo co-substrato para dioxigenases, catalisando hidroxilações envolvidas no estágio final da biossíntese de GAs (EVANS et al., 1999). Assim, o ProCa atua impedindo a formação de GAs ativas, através do bloqueio da

ação das enzimas dioxigenases envolvidas na biossíntese de GAs (GA₂₀-oxidase e GA₃-oxidase) (DAVIES, 2004).

O ProCa reduz o crescimento vegetativo em macieiras (MEDJDOUB, 2005; HAWERROTH et al. 2012; SILVEIRA et al., 2012), proporcionando o aumento do conteúdo total de Ca nos frutos, conforme observado em maçãs ‘Fuji Suprema’ (HAWERROTH, 2010). O ProCa também aumenta o conteúdo de Ca solúvel apoplástico (FREITAS et al., 2012a). Tais observações mostram que o ProCa pode reduzir a ocorrência de distúrbios fisiológicos associados à deficiência de Ca nos frutos (MEDJDOUB, 2004; FREITAS et al., 2012a; SILVEIRA et al., 2012). Todavia, pouco se sabe acerca do efeito de doses de ProCa sobre a manifestação de distúrbios fisiológicos em maçãs. Faz-se necessário conhecer o efeito do acréscimo das doses de ProCa sobre o crescimento vegetativo das plantas, a funcionalidade do xilema, a composição mineral e a manifestação do BP nos frutos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do ácido giberélico (GA₃; 330 mg L⁻¹) e de doses de proexadiona-cálcio (ProCa; 165, 330 e 495 mg L⁻¹), aplicados em macieiras ‘Fuji’ e ‘Gala’ em pós-floração, sobre o crescimento vegetativo das plantas, e a funcionalidade do xilema, a composição mineral no tecido da casca e polpa e a manifestação de distúrbios fisiológico nos frutos.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em um pomar localizado no município de São Joaquim- SC (latitude 28° 16’ 40,02” S, longitude 49° 56’ 09,10” W e altitude de 1.400 m), nas safras de 2011-2012 e 2012-2013. Foram utilizadas macieiras ‘Fuji’ e ‘Gala’ (14 anos de idade, sobre porta-enxerto ‘Marubakaido’ com filtro M9 e espaçamento de 1,5 m entre plantas e 4,5 m entre filas), conduzidas com líder central. Esta área experimental não recebeu pulverizações com cloreto de cálcio

(CaCl₂), visando a favorecer a ocorrência de BP. Durante a realização do experimento foi realizado o raleio manual dos frutos, buscando manter a uniformidade de carga de frutos por plantas entre os tratamentos.

Tabela 6- Características químicas do solo (profundidade de 0-12 cm) no pomar de macieiras ‘Fuji’ e ‘Gala’. São Joaquim, SC, 2011.

pH água	Índice SMP	Argila -----%-----	Matéria orgânica	P -----mg L ⁻¹ -----	K	Al	Ca	Mg
-----cmol L ⁻¹ -----								
5,5	5,0	32	6,3	7,1	154	0,0	7,3	3,4

Fonte: produção do próprio autor.

As macieiras ‘Fuji’ e ‘Gala’ foram pulverizadas com água (tratamento-controle), proexadione-cálcio (ProCa) nas doses de 165, 330 e 495 mg L⁻¹, e giberelina (GA₃) na dose de 330 mg L⁻¹. Cada dose de ProCa e GA₃ foi dividida em três aplicações. Para obter as doses de 165, 330 e 495 mg L⁻¹ do ProCa foram realizadas três pulverizações de 55, 110 e 165 mg L⁻¹, respectivamente. A dose de GA₃ também foi parcelada em três aplicações de 110 mg L⁻¹. A aplicação inicial ocorreu 30 dias após a plena floração (DAFP), quando as brotações do ano estavam com 10-15 cm de comprimento, sendo repetido aos 60 e 90 DAPF. Foi utilizado um volume de calda de 1.000 L ha⁻¹, procurando atingir o completo molhamento foliar das plantas. Não foi utilizado espalhante adesivo junto aos tratamentos. Como fonte de proexadione-cálcio foi utilizado o produto comercial Viviful[®] (contendo 27,5% de ingrediente ativo) e de giberelina o ProGibb[®] (contendo 10,0% de ingrediente ativo).

A avaliação da funcionalidade do xilema aconteceu apenas na safra 2011-2012, e foi realizada de acordo com o método descrito por Dražeta et al. (2004). Para isso, foram coletados 10 frutos de cada tratamento, aos 90, 129 e 150 DAPF. Os frutos foram colhidos com o pedúnculo, o qual foi seccionado

aproximadamente 1 mm da sua base e imediatamente imergido em uma solução de corante fucsina ácida 1%. O corante foi infiltrado nos frutos por cerca de 6 h, em condições de transpiração [temperatura de $25 \pm 2,0$ °C e umidade relativa (UR) de $70 \pm 10\%$], com a utilização de um ventilador para remover os efeitos da camada limítrofe de ar. Posteriormente, os frutos infiltrados foram cortados transversalmente, obtendo duas seções de 10 mm de espessura, sendo a distal (na região pistilar) e proximal (na região de inserção do pedúnculo). Após, cada seção foi avaliada quanto ao número e intensidade de coloração dos feixes no sistema vascular cortical primário e secundário, respectivamente. O número de vasos de xilema do sistema cortical primário foi determinado pelo método de análise visual. A quantificação da intensidade de coloração dos vasos do xilema, no sistema vascular cortical secundário, foi feita segundo metodologia descrita por Miqueloto et al. (2014), sendo expresso em $L \times h^\circ$. Para a determinação da intensidade de coloração do córtex foi quantificada os valores de brilho (L) e ângulo 'hue (h°)' do córtex, com um colorímetro Minolta, modelo CR 400. O aumento nos valores de $(L \times h^\circ)$ indicam uma redução na coloração dos vasos do xilema no sistema cortical secundário e perda na funcionalidade do xilema.

Na maturação comercial, foi realizada a colheita dos frutos, os quais foram separados em amostras contendo aproximadamente 100 frutos por repetição, para ambas as cultivares. Estes frutos foram armazenados em câmara fria convencional ($0 \pm 0,5$ °C e 90-95% UR), durante quatro meses, seguido de cinco dias de comercialização simulada ($25 \pm 2,0$ °C e 60-70% UR), e avaliados quanto a incidência (%) e índice de "bitter pit", e incidência de frutos podres em ambas as cultivares. Adicionalmente, também foi avaliada a incidência de escaldadura em maçãs 'Fuji' e incidência de frutos rachados e com degenerescência distal em maçãs 'Gala'. O índice de "bitter pit" foi determinado utilizando uma escala de seis níveis de danos visuais na casca: nenhuma mancha (0), uma mancha

(1), duas manchas (2), três manchas (3), quatro manchas (4), cinco manchas (5) e mais que cinco manchas (6) de “bitter pit”. Para o cálculo do índice foi utilizado a seguinte fórmula, decrita por Pesis et al. (2009):

$$\text{Índice de "bitter pit"} = \sum_0^6 \frac{(\text{nível do índice}) \times (\text{n}^\circ \text{ frutos a este nível})}{(\text{n}^\circ \text{ total de frutos})}$$

Para as análises de massa fresca, comprimento, diâmetro e composição mineral foram utilizados amostras contendo 20 frutos por repetição, obtidos no momento da colheita.

A massa fresca dos frutos foi quantificada com o auxílio de uma balança digital de precisão (0,001g), sendo os resultados foram expressos em gramas.

O comprimento e diâmetro dos frutos foram determinados com o auxílio de um paquímetro, sendo os resultados expressos em milímetros. Através desses valores foi calculada a relação comprimento/diâmetro (C/D), para avaliar o formato dos frutos.

Para as análises dos teores totais de Ca, Mg, K e N (mg kg⁻¹ de massa fresca), os frutos foram lavados com água destilada e, posteriormente, cortados na região equatorial, sendo utilizada a parte distal (região pistilar), retirando amostras do tecido da casca e polpa. Estas amostras foram processadas separadamente, conforme a metodologia descrita por Miqueloto et al. (2014). Em seguida, pesou-se 5g da amostra em cadinho de porcelana M-2 e introduziu-se em uma mufla a 600°C por 4h. Depois, adicionou-se 15 mL de uma solução de ácido clorídrico (1,8 N), formando o extrato original. Para a determinação do teor de Ca, retirou-se uma alíquota de 5 mL do extrato original e adicionou-se 5mL de óxido de lantânio, efetuando a leitura do teor mineral no equipamento de absorção atômica (modelo A analyst 100).

Para a determinação de Mg, retirou-se 2 mL do extrato original e adicionou-se 10 mL de água destilada. Desta solução, pipetou-se 5 mL e procedeu-se a metodologia descrita para a determinação de Ca. Para a determinação de K, retirou-se 1 mL do extrato original e adicionou-se 7 mL de água destilada e realizou-se a leitura em fotômetro de chama (Digimed DM-61). O N foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl, como descrito por Tedesco et al. (1995).

No mês de junho de 2012 e 2013 foram realizadas as avaliações de comprimento dos ramos do ano e a massa fresca dos ramos podados. Para a avaliação do comprimento médio dos ramos foram selecionados de forma aleatória 15 ramos no terço médio de cada lado das plantas. A medida foi obtida com o auxílio de uma fita métrica e os resultados expressos em cm. Neste mesmo período foi realizada a poda das plantas, sendo determinada a massa fresca de ramos podados (kg planta^{-1}) com uma balança analógica.

Para a análise dos dados foi utilizado o valor médio das duas safras, sendo cada cultivar analisada de forma independente. Em ambas as cultivares, foi utilizado o delineamento experimental em blocos ao caso, com oito blocos e duas plantas por unidade amostral. Os dados obtidos nos diferentes tratamentos foram inicialmente submetidos ao teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) para verificar a homogeneidade das variâncias, e ao teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO e WILK, 1965), para verificar a normalidade dos resíduos. Os dados de incidência de frutos com podridão, escaldadura, rachaduras e “bitter pit”, e a avaliação de índice de “bitter pit”, foram submetidos à transformação arco seno $[(x+5)/100]^{1/2}$ antes de serem submetidos à ANOVA. As médias de tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para avaliar o efeito das doses de ProCa foi utilizado o contraste ortogonal polinomial, considerando o tratamento controle como a dose zero. Todas as análises estatísticas foram

realizadas no *software* estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2002).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 *Desenvolvimento vegetativo das plantas*

Em macieiras ‘Fuji’ e ‘Gala’, o comprimento médio dos ramos do ano foi inferior nos tratamentos com ProCa, independente das doses utilizadas, em relação ao tratamento-controle (Tabela 7). O aumento nas doses deste composto promoveu, de forma quadrática em maçãs ‘Fuji’ e linear em maçãs ‘Gala’, a redução no tamanho dos ramos do ano (Tabela 7). O ProCa não diferiu do tratamento-controle para a massa fresca de ramos podados nas duas cultivares utilizadas (Tabela 7). Todavia, em comparação ao GA₃, a massa fresca de ramos podados foi 39% menor em macieiras ‘Fuji’ submetidas ao ProCa na dose de 495 mg L⁻¹, e 34 e 32% menores em macieiras ‘Gala’ tratadas com ProCa nas doses de 165 e 495 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 7). Nossos resultados mostram que, de forma geral, o incremento nas doses de ProCa reduziu o crescimento vegetativo das plantas em ambas as cultivares.

Segundo Hawerroth et al. (2014), a redução no crescimento vegetativo de macieiras geralmente é realizada com o emprego de portaenxertos nanizantes e/ou com a prática de podas. Porém, estas alternativas podem ser insuficientes na redução do vigor das plantas. Portanto, o uso de ProCa é uma opção para auxiliar na redução do desenvolvimento vegetativo em macieiras (HAWERROTH et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012; HAWERROTH et al., 2014).

Tabela 7- Comprimento dos ramos do ano e massa fresca de ramos podados em macieiras ‘Fuji’ e ‘Gala’, tratadas com água (controle), proexadione-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.

Tratamento	Comprimento dos ramos do ano (cm)	Massa fresca de ramos podados (kg planta ⁻¹)
‘Fuji’		
Controle	42,2 a	1,95 ab
ProCa(165mg L ⁻¹)	30,9 b	1,69 ab
ProCa (330 mg L ⁻¹)	26,8 b	1,76 ab
ProCa (495 mg L ⁻¹)	26,5 b	1,37 b
GA ₃ (330 mg L ⁻¹)	39,9 a	2,24 a
Linear 1	***	ns
Quadrática 1	***	ns
CV(%)	21,9	34,2
‘Gala’		
Controle	27,2 a	1,39 ab
ProCa (165 mg L ⁻¹)	23,4 bc	1,09 b
ProCa (330 mg L ⁻¹)	23,0 bc	1,28 ab
ProCa (495 mg L ⁻¹)	21,5 c	1,13 b
GA ₃ (330 mg L ⁻¹)	26,2 ab	1,66 a
Linear 1	***	ns
Quadrática 1	ns	ns
CV(%)	13,1	28,8

Fonte: produção do próprio autor. Média seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

¹ Contrastes ortogonais polinomiais para avaliar o efeito das doses de ProCa (considerando o controle como dose zero). *, ** e ***, para níveis de probabilidade de 0,05; 0,01 e 0,001, respectivamente. ns: não significativo (p>0,05).

3.4.2 Massa fresca, comprimento, diâmetro e relação comprimento/diâmetro (C/D) dos frutos

Em ambas as cultivares, a massa fresca dos frutos foi similar entre o controle e os tratamentos GA₃ e ProCa (Tabela 8). Porém, em maçãs ‘Gala’, o tratamento GA₃ aumentou em 8,09% e 9,22% a massa fresca dos frutos, comparado ao ProCa

nas doses 165 e 495 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 8). O aumento nas doses de ProCa reduziu de forma linear o comprimento em maçãs de ambas cultivares, o diâmetro em maçãs ‘Fuji’ e a relação C/D em ‘Gala’ (Tabela 8). O tratamento GA₃ aumentou o comprimento e a relação C/D em maçãs ‘Fuji’, comparado ao controle (Tabela 8).

Segundo Lakso et al. (1995), o crescimento de maçãs apresenta um comportamento expolinear. Entre a polinização e as quatro semanas subsequentes, o crescimento dos frutos é exponencial, decorrente da divisão celular, que declina gradativamente após este período. A fase linear, mediada pela expansão das células, ocorre entre 30 e 120 DAPF. Neste trabalho as pulverizações com ProCa aconteceram aos 30, 60 e 90 DAPF, porém não influenciaram no acúmulo de massa fresca dos frutos, independente da dose de ProCa utilizada, em relação ao controle (Tabela 8). Segundo Lakso et al. (1995), para uma taxa de crescimento celular contínua, é requerida uma demanda constante de carbono aos frutos na fase linear de crescimento. A diminuição no vigor vegetativo em plantas tratadas com ProCa (Tabela 7) pode comprometer a capacidade fotossintética das plantas. Porém, este efeito parece ser compensado pela menor competição entre frutos e ramos (folhas e brotos) pelos fotoassimilados disponíveis, diminuindo a ação do ProCa na redução da massa fresca dos frutos de ambas as cultivares, comparado ao controle. A massa fresca dos frutos também não diferiu entre os tratamentos GA₃ e controle para ambas as cultivares (Tabela 8). Possivelmente, a similaridade do crescimento vegetativo das plantas submetidas a estes tratamentos contribuiu para esta resposta.

De forma geral, o comprimento e diâmetro dos frutos de ambas as cultivares foram menores com o aumento nas doses do ProCa (Tabela 8). Medjdoub et al. (2004) também observaram uma diminuição no diâmetro de maçãs ‘Smoothie Golden Delicious’ de forma linear com o aumento nas doses de

ProCa, quando aplicado aos 29 DAPF. Possivelmente, a maiores doses de ProCa reduziram de forma mais pronunciada os níveis de GAs ativas nos frutos, comprometendo o efeito das GAs no incremento no tamanho das células do tecido cortical apical e mediano dos frutos (NAKAGAWA et al., 1967), resultando no seu menor comprimento e diâmetro. O GA₃ aumentou o comprimento e a relação C/D de maçãs 'Fuji', comparado ao controle. Esta resposta pode estar associada ao crescimento do tecido cortical apical dos frutos, quando submetidos às GAs (NAKAGAWA et al., 1967).

Tabela 8- Massa fresca, comprimento, diâmetro e relação comprimento/diâmetro de maçãs ‘Fuji’ e ‘Gala’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadiona-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.

Tratamentos	Massa fresca (g)	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Relação C/D
‘Fuji’				
Controle	176,7 a	71,3 b	78,5 a	0,908 b
ProCa (165 mg L ⁻¹)	173,0 a	69,3 b	73,4 b	0,944 ab
ProCa (330 mg L ⁻¹)	182,6 a	68,8 b	73,6 b	0,935 ab
ProCa (495 mg L ⁻¹)	178,6 a	69,3 b	73,1 b	0,948 ab
GA ₃ (330 mg L ⁻¹)	180,5 a	75,2 a	77,6 a	0,969 a
Linear ¹	ns	*	**	ns
Quadrática ¹	ns	ns	ns	ns
CV (%)	10,1	4,22	6,18	3,16
‘Gala’				
Controle	157,2 ab	62,8 abc	66,6 ab	0,943 ab
ProCa (165 mg L ⁻¹)	155,6 b	62,9 ab	66,4 ab	0,946 ab
ProCa (330 mg L ⁻¹)	159,1 ab	61,7 bc	66,7 ab	0,925 ab
ProCa (495 mg L ⁻¹)	153,7 b	61,2 c	65,8 b	0,923 b
GA ₃ (330 mg L ⁻¹)	169,3 a	64,2 a	67,7 a	0,948 a
Linear ¹	ns	**	ns	*
Quadrática ¹	ns	ns	ns	ns
CV (%)	8,31	2,92	3,56	2,51

Fonte: produção do próprio autor. Média seguidas de mesma letra, nas colunas, comparando todos os tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

¹ Contrastes ortogonais polinomiais para avaliar o efeito das doses de ProCa (considerando o controle como dose zero). *, ** e ***, para níveis de probabilidade de 0,05; 0,01 e 0,001, respectivamente. ns: não significativo (p>0,05).

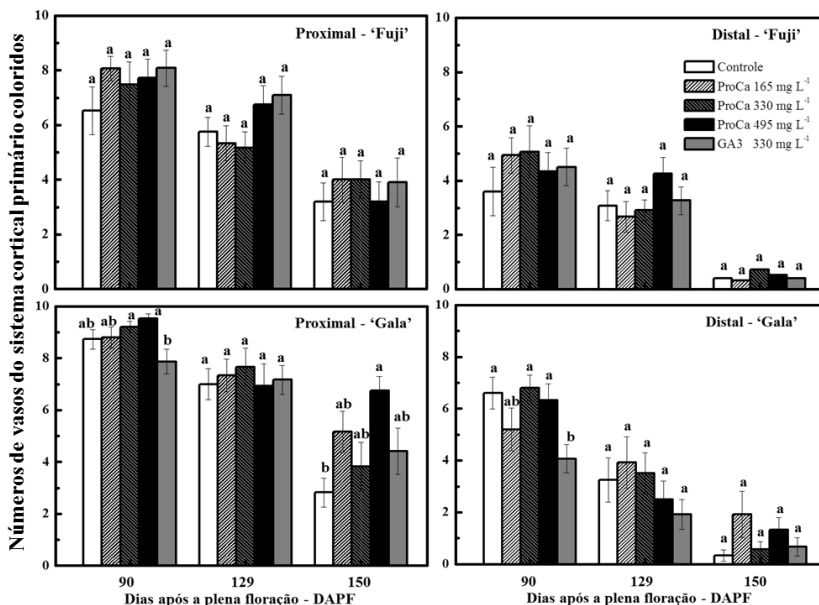
3.4.3 Funcionalidade do xilema

O número de vasos do xilema coloridos do sistema vascular primário reduziu durante o desenvolvimento dos frutos (90 aos 150 DAPF) (Figura 14). Em maçãs ‘Gala’ do

tratamento GA₃, aos 90 DAPF, foi observado um menor número de elementos de vasos de xilema coloridos, nas regiões proximal e distal dos frutos, comparado ao ProCa nas doses 330 e 495 mg L⁻¹ (Figura 14). Aos 150 DAPF, maçãs ‘Gala’ de plantas pulverizadas com ProCa 495 mg L⁻¹ também tiveram um maior número de vasos de xilema coloridos na região proximal dos frutos, em relação ao controle (Figura 14).

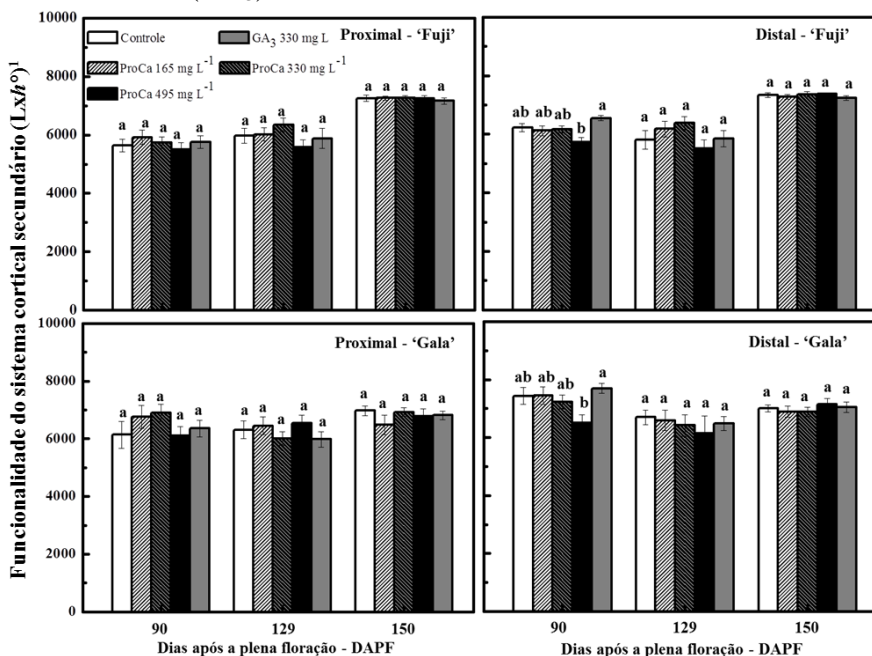
Aos 90 DAPF, os frutos de macieiras ‘Fuji’ e Gala’ tratadas com GA₃ exibiram menor funcionalidade do xilema do sistema cortical secundário, expressa em coloração do córtex ($L \times h^\circ$), na região distal, em relação ao ProCa 495 mg L⁻¹ (Figura 15). De forma geral, nossos resultados indicam uma pequena redução da funcionalidade do xilema no início do desenvolvimento de maçãs ‘Gala’ tratadas com GA₃, quando comparado as maiores doses de ProCa. Em experimento conduzido sob condições controladas, pode-se observar uma redução da funcionalidade do xilema no início do desenvolvimento em frutos de tomate tratados com GA₄₊₇ (FREITAS et al., 2012a). Possivelmente, a aplicação exógena de GAs modifica o balanço hormonal no interior dos frutos, reduzindo a relação auxina/GAs, comprometendo a diferenciação nos elementos de vasos do xilema (FREITAS & MITCHAM, 2012b), tecido vascular responsável pelo transporte de Ca aos frutos. Além disso, foi observado maior massa fresca e diâmetro em maçãs ‘Gala’ de plantas tratadas com GA₃, comparado ao ProCa 495 mg L⁻¹ (Tabela 8). Isto permite uma maior compressão dos elementos dos vasos do xilema, em resposta à expansão celular, resultando no colapso deste tecido condutor (DRAŽETA et al., 2004), e na menor funcionalidade do xilema nos frutos. Tais fatores podem contribuir para a redução na funcionalidade do xilema do sistema cortical primário e secundário de maçãs ‘Gala’ submetidos ao tratamento GA₃, em relação ao ProCa na dose 495 mg L⁻¹.

Figura 14- Números de vasos do xilema do sistema cortical primário coloridos, nas regiões proximal e distal de maçãs ‘Fuji’ e ‘Gala’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadiona-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores da safra 2011-2012.



Fonte: produção do próprio autor. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 15- Números de vasos do xilema do sistema cortical secundário (coloração do córtex, expresso em $L \times h^\circ$), nas regiões proximal e distal de maçãs ‘Fuji’ e ‘Gala’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadiona-cálcio (ProCa) e giberelina (GA_3). Valores da safra 2011-2012.



Fonte: produção do próprio autor. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Média seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹ Aumento nos valores de $L \times h^\circ$ indica redução na coloração dos vasos do xilema no sistema cortical secundário e perda na funcionalidade do xilema.

3.4.4 Composição mineral dos frutos

O equilíbrio entre desenvolvimento vegetativo e reprodutivo é importante nas plantas, pois influencia na relação frutos/folhas e, assim, na competição pelo conteúdo total de Ca

disponível, possivelmente comprometendo a composição mineral dos frutos (GREENE, 1991).

O aumento nas doses de ProCa diminuiu linearmente o conteúdo total de Ca no tecido polpa em maçãs ‘Fuji’ (Tabela 9) e no tecido casca em maçãs ‘Gala’ (Tabela 10). Todavia, independente da dose de ProCa utilizada, foi observado uma redução no comprimento médio dos ramos em ambas as cultivares em relação ao controle (Tabela 7). Isto pode acarretar em plantas mais compactas e com maior sombreamento na porção interna do dossel, conforme o observado por Cline et al. (2008). Nesta condição, os frutos podem ficar expostos a um microclima propício a menor transpiração, predispondo ao menor fluxo de água no xilema (MONTANARO et al., 2006; MONTANARO et al., 2010). O Ca é conduzido exclusivamente via xilema, sendo que o menor fluxo de água neste tecido condutor reduz o aporte deste íon e pode diminuir o conteúdo total de Ca nos frutos (FERGUSON; WATKINS, 1989).

A pulverização de macieiras com GA_3 alterou a composição mineral dos frutos. No tecido casca de maçãs ‘Fuji’, este tratamento aumentou a relação K/Ca em comparação aos demais tratamentos, e aumentou a relação (K+Mg)/Ca em relação aos tratamentos com ProCa nas doses de 330 e 495 mg L⁻¹ (Tabela 9). O GA_3 também aumentou a relação N/Ca no tecido polpa de maçãs ‘Gala’ em relação ao ProCa 495 mg L⁻¹ (Tabela 10). Resultados similares foram reportados no tecido casca de maçãs ‘Fuji’ submetidas ao tratamento com GA_3 , em relação ao ProCa (SILVEIRA et al., 2012). Os resultados mostram que as diferenças obtidas para a relação mineral com o Ca, no tecido casca em ‘Fuji’ e polpa em ‘Gala’, foram mais pronunciadas entre o GA_3 e as maiores doses de ProCa utilizadas.

O número de elementos de vasos de xilema coloridos na região distal dos frutos de ambas as cultivares reduziu após o

129 DAPF (Figura 14), sugerindo um menor aporte de Ca aos frutos a partir deste período. No entanto, por apresentar contínua síntese de parede celular, possivelmente os vasos do floema permanecem funcionais na condução dos minerais K, Mg e N, contribuindo para o aumento na relação entre estes minerais com o Ca (TROMP, 1972). Além disso, a aplicação exógena de GAs pode aumentar a relação hormonal entre GAs/auxina e induzir a diferenciação nos vasos do floema (ALONI et al., 1990), favorecendo o aporte dos elementos minerais N, K e Mg aos frutos. Desta forma, o GA₃ pode aumentar os teores de N, K e Mg na região distal dos frutos, resultando nas maiores relações K/Ca e (Mg+K)/Ca no tecido casca de maçãs ‘Fuji’ e N/Ca no tecido polpa de maçãs ‘Gala’, principalmente em relação as maiores doses de ProCa.

Tabela 9- Teores de Ca e valores das relações N/Ca, K/Ca, Mg/Ca, (K+Mg)/Ca e (K+Mg+N)/Ca no tecido da casca e polpa de maçãs 'Fuji', colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadione-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.

Tratamentos	Ca	N/Ca	K/Ca	$\frac{Mg}{Ca}$	$\frac{K+Mg}{Ca}$	$\frac{K+Mg+N}{Ca}$
	(mg.kg ⁻¹ de massa fresca)					
Casca						
Controle	114,8 a	8,64 a	21,7 b	0,97 a	22,3 ab	30,1 a
ProCa (165 mg L ⁻¹)	134,0 a	9,34 a	19,9 b	0,99 a	25,9 ab	35,9 a
ProCa (330 mg L ⁻¹)	116,9 a	7,93 a	17,8 b	0,89 a	18,5 b	23,0 a
ProCa (495 mg L ⁻¹)	123,9 a	6,79 a	18,9 b	0,85 a	19,6 b	25,0 a
GA ₃ (330 mg L ⁻¹)	120,5 a	8,66 a	33,6 a	0,88 a	33,9 a	43,3 a
Linear ¹	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Quadrática ¹	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	23,0	19,2	20,0	13,1	22,9	24,6
Polpa						
Controle	34,5 a	9,31 a	39,1 a	1,38 a	40,1 a	49,3 a
ProCa (165 mg L ⁻¹)	33,5 a	8,19 a	37,0 a	1,23 a	37,8 a	45,9 a
ProCa (330 mg L ⁻¹)	34,2 a	8,94 a	33,2 a	1,30 a	34,2 a	40,8 a
ProCa (495 mg L ⁻¹)	29,7 a	7,17 a	36,1 a	1,29 a	34,9 a	41,8 a
GA ₃ (330 mg L ⁻¹)	30,6 a	8,49 a	37,8 a	1,25 a	37,7 a	46,1 a
Linear ¹	*	ns	ns	ns	ns	ns
Quadrática ¹	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	6,18	11,7	10,2	10,5	10,1	10,9

Fonte: produção do próprio autor. Média seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

¹ Contrastes ortogonais polinomiais para avaliar o efeito das doses de ProCa (considerando o controle como dose zero). *, ** e ***, para níveis de probabilidade de 0,05; 0,01 e 0,001, respectivamente. ns: não significativo (p>0,05).

Tabela 10- Teores de Ca e valores das relações N/Ca, K/Ca, Mg/Ca, (K+Mg)/Ca e (K+Mg+N)/Ca no tecido da casca e polpa de maçãs ‘Gala’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadione-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.

Tratamentos	Ca					
	(mg.kg ⁻¹ de massa fresca)	N/Ca	K/Ca	Mg/Ca	$\frac{K+Mg}{Ca}$	$\frac{K+Mg+N}{Ca}$
	Casca					
Controle	158,4 a	5,76 a	9,59 a	0,77 a	10,2 a	15,8 a
ProCa (165 mg L ⁻¹)	156,9 a	5,11 a	9,38 a	0,82 a	10,0 a	15,5 a
ProCa (330 mg L ⁻¹)	137,6 a	5,55 a	12,4 a	0,96 a	13,2 a	21,7 a
ProCa (495 mg L ⁻¹)	139,9 a	4,59 a	11,0 a	0,95 a	11,8 a	16,2 a
GA ₃ (330 mg L ⁻¹)	134,1 a	7,34 a	13,2 a	0,87 a	13,9 a	19,0 a
Linear ¹	*	ns	ns	ns	ns	ns
Quadrática ¹	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	18,4	18,5	14,5	10,9	13,9	14,8
	Polpa					
Controle	46,8 a	5,34 ab	24,6 a	1,28 a	25,5 a	31,2 a
ProCa (165 mg L ⁻¹)	47,9 a	5,76 ab	22,6 a	1,25 a	23,4 a	29,0 a
ProCa (330 mg L ⁻¹)	51,0 a	5,42 ab	22,9 a	1,29 a	23,8 a	29,6 a
ProCa (495 mg L ⁻¹)	48,5 a	4,38 b	22,6 a	1,38 a	23,0 a	27,3 a
GA ₃ (330 mg L ⁻¹)	46,4 a	6,43 a	26,3 a	1,14 a	27,5 a	34,0 a
Linear ¹	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Quadrática ¹	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	5,93	12,0	9,80	10,6	9,52	9,60

Fonte: produção do próprio autor. Média seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

¹ Contrastes ortogonais polinomiais para avaliar o efeito das doses de ProCa (considerando o controle como dose zero). *, ** e ***, para níveis de probabilidade de 0,05; 0,01 e 0,001, respectivamente. ns: não significativo (p>0,05).

3.4.5 Manifestação de “bitter pit”, escaldadura e rachaduras nos frutos

Os tratamentos ProCa e GA₃ não diferiram do controle para o desenvolvimento de BP em ambas as cultivares (Tabelas 11 e 12). Porém, em maçãs ‘Fuji’, os tratamentos com ProCa nas doses de 330 e 495 mg L⁻¹ diminuíram em 30 e 42%, respectivamente, a incidência de BP, e o tratamento com ProCa na dose de 495 mg L⁻¹ reduziu em 44% o índice de BP, comparativamente ao tratamento com GA₃ (Tabela 11). O aumento nas doses de ProCa também reduziu de forma linear a incidência de BP nos frutos desta mesma cultivar (Tabela 11). Em maçãs ‘Gala’, a incidência de BP foi menor nos frutos de plantas tratadas com ProCa na dose de 165 mg L⁻¹, em comparação ao tratamento com GA₃ (Tabela 12). Nossos resultados indicam que o efeito do acréscimo nas doses de ProCa, em conter o desenvolvimento de BP em ‘Fuji’, pode estar vinculado ao melhor equilíbrio mineral entre K/Ca e (K+Mg)/Ca no tecido casca dos frutos, quando submetidos as maiores doses do produto (Tabela 9). Porém, em maçãs ‘Gala’, não foi observado uma relação entre a composição mineral total e a manifestação de BP nos frutos, quando submetidos aos tratamentos ProCa na dose 165 mg L⁻¹ e GA₃.

O efeito do ProCa em reduzir a ocorrência de BP também foi reportado por outros autores (MEDJDOUB et al., 2004; SILVEIRA et al., 2012). Em geral, a aplicação de inibidores de crescimento, como o ProCa e paclobutrazol, resultam em menor incidência de BP e demais distúrbios fisiológicos em maçãs (GREENE, 1991; MEDJDOUB et al., 2004). Esta condição pode estar associada ao aumento no conteúdo de Ca total e/ou redução nas relações K e Mg com o Ca nos frutos tratados com ProCa, comparado ao GA₃, conforme o observado em maçãs ‘Catarina’ (SILVEIRA et al., 2012). Ao formar ligações com o íon fosfato e/ou grupos carboxílicos dos fosfolipídeos e proteínas, o Ca desempenha um papel fundamental na estabilização da membrana plasmática (MP) e integridade celular (MARSCHNER, 2012).

Desta forma, o Ca atua inibindo o colapso da MP e a manifestação do BP nos frutos (FREITAS et al., 2010). No entanto, os elementos minerais Mg e K competem pelos mesmos sítios de ligação com o Ca na MP, não desempenhando a mesma função (FREITAS et al., 2010). O incremento destes minerais pode influenciar de forma negativa na manutenção da integridade da MP, predispondo o extravasamento do líquido celular e o desenvolvimento do BP nos frutos (FREITAS et al., 2010).

A manifestação de BP não se deve apenas ao conteúdo total de minerais nos frutos, mas também à homeostase de Ca a nível celular (FREITAS et al., 2010). A utilização do ProCa proporciona o aumento no conteúdo de Ca apoplástico nos tecidos do pericarpo em tomates, diminuindo a manifestação da podridão apical, distúrbio associado à deficiência de cálcio (FREITAS et al., 2012a). Este comportamento pode ser resultado da menor expressão dos genes que codificam a *Ca-ATPase* (FREITAS et al., 2012a), proteína transportadora que utiliza o ATP como fonte de energia para bombear o Ca para o interior do vacúolo (FREITAS et al., 2010). A menor expressão deste transportador pode contribuir para o incremento do Ca livre na região do apoplasto, devido à redução do transporte deste mineral para o vacúolo. Desta forma, o ProCa pode aumentar o conteúdo de Ca solúvel apoplástico e assim manter a integridade da MP (FREITAS et al., 2012a), prevenindo a manifestação do distúrbio fisiológico associado a deficiência de Ca. Este mesmo mecanismo pode explicar a menor manifestação de BP em maçãs ‘Fuji’ submetidas às maiores doses ProCa e em ‘Gala’ tratada com ProCa na dose de 165 mg L⁻¹, comparativamente ao GA₃.

O aumento nas doses de ProCa reduziu de forma linear a incidência de escaldadura superficial em maçãs ‘Fuji’ (Figura 16; Tabela 11). Nesta mesma cultivar, o tratamento com ProCa na dose de 495 mg L⁻¹ reduziu em 34% a manifestação deste

distúrbio fisiológico, comparado ao tratamento com GA₃ na dose de 330 mg L⁻¹ (Tabela 5).

A escaldadura superficial ocorre geralmente após alguns meses de armazenamento em atmosfera refrigerada, sendo caracterizado pela exteriorização de manchas escuras e difusas na região da epiderme dos frutos (FAN et al., 1999). A oxidação da α -farneseno pode predispor o desenvolvimento deste distúrbio fisiológico através da produção de trienóis conjugado e 6-metil-5-hepteno-2-ona (WHITAKER, 2004). Estes compostos reagem com proteínas e lipídeos presentes nas membranas celulares resultando na perda de sua integridade (SKOBEL et al., 1997). Isto pode facilitar o acesso das enzimas *polifenoloxidasas* aos compostos fenólicos no vacúolo, levando a produção de o-quinonas, compostos que quando polimerizados formam pigmentos escuros, as melanoidinas (NICOLAS et al., 1994). O acúmulo destes pigmentos resulta nos sintomas de escaldadura nos frutos, que dependendo da severidade, pode culminar na morte das células hipodérmicas (MOGGIA et al., 2010). Existe uma relação entre a produção de etileno e a manifestação de escaldadura nos frutos. Este hormônio promove o aumento na atividade da α -farneseno *sintase* e acúmulo da α -farneseno na cera epicuticular e tecidos da epiderme dos frutos, podendo contribuir para o desenvolvimento da escaldadura (WHITAKER, 2004). Possivelmente, a redução na manifestação de escaldadura observada neste trabalho esteja associada a menor produção de etileno nos frutos quando submetidos ao ProCa, considerando o efeito deste composto em controlar a biossíntese deste hormônio (RADEMACHER, 2000).

Por outro lado, em trabalho comparando variedades de maçã resistente e suscetível a escaldadura, também foi observado uma estreita relação entre o aumento na severidade de escaldadura nos frutos com os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação de lipídeos, em detrimento a

menor atividade das enzimas peroxidase e catalase (RAO et al., 1998). As enzimas peroxidase e catalase atuam metabolizando o H_2O_2 em H_2O , evitando o acúmulo das espécies reativas ao oxigênio (ERO) no tecido vegetal, consequentemente diminuindo a manifestação de escaldadura em maçãs (RAO et al., 1998). Segundo Ramírez et al. (2010), existe uma relação entre o aumento nas doses de ProCa e a atividade das enzimas peroxidase e catalase em frutos de tomate. Esta condição pode melhorar a capacidade antioxidante dos frutos, tornando-os mais tolerantes ao estresse oxidativo e a manifestação de escaldadura (RAO et al., 1998). Sendo assim, o aumento nas doses de ProCa também pode ter contribuído para o incremento na capacidade antioxidante em maçãs ‘Fuji’, possivelmente proporcionando o controle na manifestação do BP e da escaldadura superficial nos frutos.

Para a ocorrência de rachadura nos frutos, não foi observado diferença dos tratamentos ProCa e GA_3 com relação ao controle (Tabela 12). O tratamento GA_3 aumentou a porcentagem de frutos rachados em maçãs ‘Gala’ (Figura 16), em relação ao tratamento com ProCa na dose de 495 mg L^{-1} (Tabela 12).

A ocorrência de rachaduras tem sido constatada em diversos frutos (PEET, 1992; KASAI et al., 2008; KONG et al., 2013). Os sintomas de rachadura são variáveis, podendo ser manifestado na região lateral ou nas extremidades (região proximal e distal) dos frutos, expondo o tecido da polpa (KONG et al., 2013). Muitos são os fatores que predisõem o desenvolvimento de rachadura nos frutos. O aumento na expressão das expansinas no tecido do mesocarpo de maçãs resultou na incapacidade das células do pericarpo em acompanhar sua expansão, induzindo o desenvolvimento deste distúrbio fisiológico (KASAI et al., 2008). Segundo Peet (1992), outras características também podem tornar os frutos mais suscetíveis as rachaduras, como baixa resistência à ruptura e/ou extensibilidade da epiderme em estádios

avançados de maturação, espessura da epiderme e tamanho dos frutos. Nossos resultados mostram que a manifestação de rachadura aumenta com a aplicação de GA₃, possivelmente devido ao efeito na promoção do comprimento e diâmetro dos frutos, comparado ao ProCa na dose 495 mg L⁻¹ (Tabela 8). Existe uma alta correlação entre o aumento no volume dos frutos e a expansão das células do tecido do mesocarpo, em resposta ação das expansinas (KASAI et al., 2008). Portanto, as GAs podem aumentar a expressão da xiloglucano endotransglicosilase (XET), enzima que atua aumentando a viscosidade da parede celular em resposta ao enfraquecimento das cadeias de xiloglucano (ATKINSON et al., 2009; HAN et al., 2015), permitindo o processo de expansão celular em resposta ao turgor celular. Isto pode promover o aumento no tamanho das células do mesocarpo, em relação ao pericarpo, predispondo o desenvolvimento de rachadura nos frutos.

Por outro lado, as GAs também podem aumentar a produção de etileno, por intermédio da maior atividade da *S-adenosilmetionina sintase* (LI et al., 2015). Isto pode contribuir para o aumento na atividade da enzima poligalacturonase (PG) e reduzir a consistência dos frutos (MAJUMDER; MAZUMDAR, 2002), indicando uma modificação na estrutura da parede celular e tornando os frutos mais vulneráveis ao desenvolvimento de rachaduras quando submetidos ao GA₃.

Tabela 11- Ocorrência de “bitter pit” (BP), podridões e escaldadura em maçãs ‘Fuji’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadione-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.

Tratamentos	Incidência	Índice	Incidência de fruto com	
	-----de BP----- (%)	(0 - 6)	Podridões	Escaldadura
			------(%)-----	
Controle	16,9 ab	0,445 ab	8,05 a	21,2 ab
ProCa (165 mg L ⁻¹)	15,5 ab	0,402 ab	6,20 a	21,9 ab
ProCa (330 mg L ⁻¹)	14,2 b	0,382 ab	9,54 a	19,1 ab
ProCa (495 mg L ⁻¹)	11,9 b	0,327 b	9,57 a	17,0 b
GA ₃ (330 mg L ⁻¹)	20,4 a	0,585 a	10,8 a	25,9 a
Linear ¹	**	ns	ns	*
Quadrática ¹	ns	ns	ns	ns
CV (%)	34,4	49,5	42,1	44,4

Fonte: produção do próprio autor. Média seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

¹ Contrastes ortogonais polinomiais para avaliar o efeito das doses de ProCa (considerando o controle como dose zero). *, ** e ***, para níveis de probabilidade de 0,05; 0,01 e 0,001, respectivamente. ns: não significativo (p>0,05).

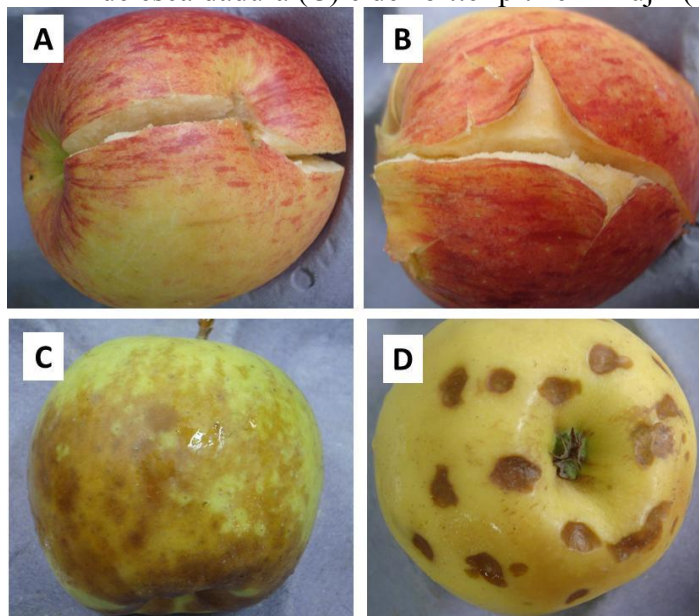
Tabela 12- Ocorrência de “bitter pit” (BP), podridões, rachaduras e degenerescência distal (DEG) em maçãs ‘Gala’, colhidas de plantas tratadas com água (controle), proexadione-cálcio (ProCa) e giberelina (GA₃). Valores médios das safras 2011-2012 e 2012-2013.

Tratamentos	Incidência	Índice	Incidência de frutos com		
	-----de BP----- (%)	(0 - 6)	Podridões	Rachaduras	DEG
	------(%)-----				
Controle	10,8 ab	0,273 a	3,63 a	2,10 ab	3,80 a
ProCa (165 mg L ⁻¹)	7,21 b	0,193 a	4,67 a	2,87 ab	3,62 a
ProCa (330 mg L ⁻¹)	10,2 ab	0,331 a	5,57 a	2,70 ab	5,19 a
ProCa (495 mg L ⁻¹)	8,81 ab	0,256 a	3,66 a	0,92 b	2,77 a
GA ₃ (330 mg L ⁻¹)	11,1 a	0,273 a	4,09 a	3,35 a	4,36 a
Linear ¹	ns	ns	ns	ns	ns
Quadrática ¹	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	22,7	38,0	47,0	85,1	48,8

Fonte: produção do próprio autor. Média seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

¹ Contrastes ortogonais polinomiais para avaliar o efeito das doses de ProCa (considerando o controle como dose zero). *, ** e ***, para níveis de probabilidade de 0,05; 0,01 e 0,001, respectivamente. ns: não significativo (p>0,05).

Figura 16- Sintomas de rachaduras em maçãs ‘Gala’ (A e B), de escaldadura (C) e de “bitter pit” em ‘Fuji’ (D).



Fonte: produção do próprio autor.

3.4.6 Considerações gerais

O uso do ProCa é uma alternativa para o controle no crescimento vegetativo de macieiras. Ainda, o aumento nas doses deste composto contribui para a redução na manifestação de “bitter pit” e escaldadura em maçãs ‘Fuji’. Em anos ou safras agrícolas propícias a ocorrência de “bitter pit”, o ProCa pode auxiliar no controle deste distúrbio fisiológico, mas este efeito parece ser variável entre as cultivares de maçã utilizadas. Faz-se necessário averiguar em trabalhos futuros o efeito do aumento das doses de ProCa sobre a capacidade antioxidante dos frutos, o conteúdo de Ca solúvel apoplástico e a expressão dos genes codificam para transportadores de Ca e bombas eletrogênicas no tonoplasto. Isto contribuirá para o melhor entendimento do efeito do ProCa na manifestação de distúrbios

fisiológico associados a deficiência de Ca em diferentes cultivares de maçãs.

3.5 CONCLUSÕES

O aumento nas doses de ProCa reduz o comprimento médio dos ramos do ano em macieira ‘Fuji’ e ‘Gala’.

Macieiras ‘Fuji’ pulverizadas com doses crescentes de ProCa tende a apresentar frutos com menor conteúdo total de Ca no tecido polpa, e menor manifestação de “bitter pit” e escaldadura. Os menores valores das relações K/Ca e (K+Mg)/Ca no tecido casca dos frutos desta mesma cultivar ocorrem nas maiores doses de ProCa (330 e 495 mg L⁻¹).

A manifestação de rachaduras e a relação N/Ca no tecido polpa são maiores e a funcionalidade do xilema no início do desenvolvimento dos frutos é menor em maçãs ‘Gala’ de plantas pulverizadas com GA₃, comparado ao tratamento ProCa na dose de 495 mg L⁻¹, sem diferir do tratamento-controle. O aumento nas doses de ProCa reduz o conteúdo total de Ca no tecido casca em frutos de macieiras ‘Gala’.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As condições climáticas e o manejo empregado na cultura foram diferentes entre o experimento desenvolvido nos Estados Unidos e no Brasil. As altas temperaturas na primavera e no verão e o fornecimento de água as plantas durante safra, pelo sistema de irrigação, contribuiu para um crescimento vegetativo maior em macieiras cultivadas na região de Sacramento (Califórnia, Estados Unidos), do que em São Joaquim (Santa Catarina, Brasil). Apesar da diferença, quando aplicado em pós-floração, o proexadiona-cálcio foi eficiente no controle vegetativo de macieiras cultivadas em ambas as condições. Adicionalmente, o aumento nas doses de proexadiona-cálcio em pós-floração diminuiu o crescimento vegetativo de macieiras cultivadas em São Joaquim. Estes resultados sugerem que quando aplicado em pós-floração, o proexadiona-cálcio, pode auxiliar na redução do desenvolvimento vegetativo de macieiras.

A utilização exógena de giberelina influencia na manifestação de distúrbios fisiológicos associados à deficiência de Ca em maçãs. Pode-se observar que a pulverização de macieiras com GA₄₊₇ em pós-floração aumenta a expressão da *Ca-ATPase 1* e *H⁺-PPase* e a incidência de “bitter pit” nos frutos. Em partes este resultado pode associar-se a homeostase anormal de Ca a nível celular em resposta ao tratamento com giberelina (FREITAS et al., 2012). Porém, a utilização de giberelinas também pode aumentar a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) nos frutos (SAURE, 2014; LI et al., 2015), e de forma sinérgica contribuir para o desenvolvimento dos distúrbios fisiológicos. Estudos futuros nesta linha de pesquisa são fundamentais para o entendimento do efeito do hormônio giberelina sobre a manifestação destes distúrbios fisiológicos associados a deficiência de Ca em maçãs.

O aumento nas doses do proexadiona-cálcio (inibidor da síntese de giberelinas) reduz a incidência de “bitter pit” e de escaldadura em maçãs ‘Fuji’. O aumento na atividade das enzimas peroxidase e catalase em resposta ao proexadiona-cálcio pode tornar os frutos mais tolerantes ao estresse oxidativo (RAMÍREZ et al., 2010), sugerindo um aumento na sua capacidade antioxidantes. Desta forma, a utilização do proexadiona-cálcio pode diminuir a manifestação de distúrbios fisiológicos. Porém, faz-se necessário investigar o efeito do proexadiona-cálcio sobre a capacidade antioxidante em maçãs, como forma de esclarecer os demais benefícios deste composto a cultura da macieira.

A utilização do proexadione-cálcio em pré-colheita mostrou-se eficiente no atraso da maturação de macieiras ‘Breaburn’ cultivadas sob as condições de manejos e climáticas encontradas nos Estados Unidos. Porém, este mesmo tratamento comprometeu o desenvolvimento da cor vermelha dos frutos. Trabalhos futuros nesta linha de pesquisa são interessantes para elucidar outras vantagens deste composto. Porém, é necessário contrastar doses menores de proexadione-cálcio (doses a nível comercial), diferentes condições de cultivos e épocas de colheita dos frutos, como forma de analisar a possível aplicabilidade deste composto para esta finalidade no cultivo de macieira.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONI R.; TOLLIER, M.T.; MONTIES, B. The role of auxin and gibberellin in controlling lignin formation in primary phloem fibers and in xylem of *Coleus blumei* stems. **Plant Physiology**, New York, v.94, n.4, p.1743-1747, 1990.

AMARANTE, C.V.T.; Steffens, C.A.; Blum, L.E.B. Coloração do fruto, distúrbios fisiológicos e doenças em maçãs ‘Gala’ e ‘Fuji’ pulverizadas com aminoetoxivinilglicina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.1, p.9-18, 2010.

AMARANTE, C.V.T.; CHAVES, D.V.; ERNANI, P.R. Análise multivariada de atributos nutricionais associados ao “bitter pit” em maçãs ‘Gala’. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.5, p.841-846, 2006.

AMARANTE, C.V.T.; DREHMER, A.M.F.; SOUZA, F.; FRANCESCOTTO, P. A pulverização pré-colheita com ácido giberélico (GA₃) e aminoetoxivinilglicina (AVG) retarda a maturação e reduz as perdas de frutos na cultura do pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.1-5, 2005.

AMARANTE, C.V.T.; ERNANI, P.R.; STEFFENS, C.A.; ARGENTA, L.C. O teor de cálcio na casca é indicativo da suscetibilidade ao “bitter pit” em maçãs ‘Fuji’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.1, p.180-186, 2011.

AMARANTE, C.V.T.; SIMIONI, A.; MEGGUER, C.A.; BLUM, L.E.B. Effect of aminoethoxyvinilglicine (AVG) on preharvest fruit drop and maturity of apples. **Revista**

Brasileira Fruticultura, Jaboticabal, v.24, n.3, p.661-664, 2002.

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

AWAD, M.A.; JADER, A. Formation of flavonoids especially anthocyanin and chlorogenic acid in 'Jonagold' apple skin: influences of growth regulators and fruit maturity. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.93, n.3, p.257-266, 2002.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society**, London, v.160, n.901, p.268-282, 1937.

BAUR, J.R.; WORKMAN, M. Relationship between cell permeability and respiration in ripening banana fruit tissue. **Plant Physiology**, New York, v.39, n.4 p.540-543, 1964.

BEAVERS W. B.; SAMS, C. E.; CONWAY, W. S.; BROWN, G. A. Calcium source affects calcium content, firmness, and degree of injury of apples during storage. **Hortscience**, Palo Alto, v.29, n.12, p.1520-1523, 1994.

BEN ARIE, R.; SAKS, Y.; SONEGO, L.; FRANK, A. Cell wall metabolism in gibberellin-treated persimmon fruits. **Plant Growth Regulators**, Amsterdam, v.19, n.1, p.25-33, 1996.

BIZJAK, J.; JAKOPIC, J.; SLATNAR, A.; STAMPAR, F.; STICH, K.; HALBWIRTH, H.; ZADRAVEC, P.; VEBERIC, R. Late prohexadione-calcium application on maturing apple cv. 'Braeburn' fruit reduces anthocyanins and alters the

phenolic content. **European Journal Horticultural Science**, v.77, n.4, p.154-162, 2012.

BRACKMANN, A.; SCHORR, M.R.W.; PINTO, J.A.V.; VENTURINI, T.L. Aplicações pré-colheita de cálcio na qualidade pós-colheita de maçãs 'Fuji'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.6, p.1435-1438, 2010.

BUENO, T.I.; GIBSON, E.J.; SCHOFIELD, C.J.; JOHN, P. Inhibition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by 2-oxoacids. **Phytochemistry**, Québec City, v.43, n.2, p.343-349, 1996.

BYERS, R.E. Effects of aminoethoxyvinylglycine (AVG) on preharvest fruit drop, maturity and cracking of several apple cultivars. **Journal of Tree Fruit Production**, Chicago, v.2, n.1, p.77-97, 1997.

BYERS, R.E.; YODER, K.S. Prohexadione–calcium inhibits apple, but not peach, tree growth, but has little influence on apple fruit thinning or quality. **HortScience**, Palo Alto, v.34, n.7, p.1205-1209, 1999.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CLINE, J.A.; EMBREE, C.G.; HEBB, J.; NICHOLS, D.S. Performance of prohexadione-calcium on shoot growth and fruit quality of apple: Effect of spray surfactants. **Canadian Journal of Plant Science**, Québec city, v.88, n.1, p.165-174, 2008

CONEVA, E.; CLINE, J. A. Gibberellic acid inhibits flowering and reduces hand thinning of 'Redhaven' peach. **HortScience**, Palo Alto, v.41, n.7, p.1596-1601, 2006.

CONWAY, W. S.; GROSS, K. C.; BOYER, C. D.; SAMS, C. E. Inhibition of *Penicillium expansum* poligalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. **Phytopathology**, Saint Paul, v.78, n.8, p.1052-1055, 1988.

CONWAY, W.S.; SAMS, C.E.; ABBOTT, J.A.; BRUTON, B.D. Postharvest calcium treatment of apple fruit to provide broad-spectrum protection against postharvest pathogens. **Plant Disease**, New York, v.75, n.6, p.620-622, 1991.

COOPER, T.; BANGERTH, F. The effect of Ca and Mg treatments on the physiology, chemical composition and bitter pit development of 'Cox's Orange' apples. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.5, n.1, p.49-57, 1976.

DAVIES, P.J. **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction and action**. 3^a edição. Dordrecht: Netherlands, 2004. 775p.

DRAŽETA L.; LANGA, A.; CAPPELLINIA, C.; HALLA, A.J.; VOLZC, R.K.; JAMESONB, P.E. Vessel differentiation in the pedicel of apple and the effects of auxin transport inhibition. **Physiologia Plantarum**, Helsink, v.120, n.1, p.162-170, 2004

DRAZETA, L.; LANG, A.; HALL, A.J.; VOLZ, R.K. Causes and effects of changes in xylem functionality in apple fruit. **Annals of Botany**, Oxford, v.93, n.3, p.275-282, 2004.

EVANS, J.R.; EVANS, R.R.; REGUSCI, C.L. Mode of action, metabolism, and uptake of bas 125w, prohexadione-calcium. **Hortscience**, Palo Alto, v. 4, n.7, p. 1200-1201, 1999.

FAN, X.; MATTHEIS, J.P.; BLANKENSHIP, S. Development of apple superficial scald, soft scald, core flush, and greasiness is reduced by MCP. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, München, v.47, n.8, p.3063-3068, 1999.

FARAGHER, J. D.; BROHIER, R.L. Anthocyanin accumulation in apple skin during ripening: regulation by ethylene and phenylalanine ammonia-lyase. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.22, n.1, p.89-96, 1984.

FERGUSON, I.B.; WATKINS, C.B. Bitter-pit in apple fruit. **Horticultural Reviews**, New York, v.11, n.1 p.289-355, 1989.

FERGUSON, I.B.; WATKINS C.B. Crop load effects on mineral concentrations and incidence of bitter pit in 'Cox's Orange Pippin' apple. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Alexandria, v.117, n.3, p.373-376, 1992.

FREITAS, S.T.; AMARANTE, C.V.T.; LABAVITCH, J.M.; MITCHAM, E.J. Cellular approach to understand bitter pit development in apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.57, n.1, p.6-13, 2010.

FREITAS, S.T.; JIANG, C.Z.; MITCHAM, E.J. Mechanisms involved in calcium deficiency development in tomato fruit in response to gibberellins. **Journal of Plant Growth Regulation**, Verona, v. 31, n.2, p.221-234, 2012a.

FREITAS, S.T.; MITCHAM, E.J. Factors involved in fruit calcium deficiency disorders. **Horticultural Reviews**, New York, v.40, n.1, p.107-146, 2012b.

GLENN, M.; POOVAIAH, B.W. Role of calcium in delaying softening of apples and cherries. **Postharvest Pomology Newsletter**, Washington, v.5, n.1, p.10-19, 1987.

GREENE, D.W. Gibberellins A₄₊₇ influence fruit set, fruit quality, and return bloom of apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Salt Lake City, v.114, n.4, p.619-625, 1989.

GREENE, D.W. Preharvest drop control and maturity of 'Delicious' apples as affected by aminoethoxyvinylglycine (AVG). **Journal of Tree Fruit Production**, Chicago, v.3, n.1, p.1-10, 2002.

GREENE, D.W. Reduced rates and multiple sprays of paclobutrazol control growth and improve fruit quality of 'Delicious' apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.116, n.5, p.807-812, 1991.

GREENE, D.W. Tree growth management and fruit quality of apple trees treated with prohexadione calcium (BAS 125). **HortScience**, Alexandria, v.34, n.7, p.1209-1212, 1999.

GROSSMANN K. Plant growth retardants: their mode of action and benefit for physiological research. **Progress in plant growth regulation**, Amsterdam, v.13, p.778-792, 1992.

HAGERMAN, A.E.; AUSTIN, P. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.34, n.3, p.440–444, 1986.

HALBWIRTH, H.; FISCHER, T.C.; SCHLANGEN, K.; RADEMACHER W.; SCHLEIFER, K. J.; FORKMANN, G.; STICH, K. Screening for inhibitors of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases: Flavanone 3 β -hydroxylase and flavonol synthase. **Plant Science**, New York, v.171, n.2, p.194-205, 2006.

HAWERROTH, J.F.; PETRI, J.L. Crescimento vegetativo de macieiras ‘Fuji Suprema’ sob influência da época de aplicação de prohexadione cálcio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.36, n.2, p.373-380, 2014.

HAWERROTH, J.F.; PETRI, J.L.; LEITE, G.B.; YOSHIKAWA, E.R. Épocas de aplicação de proexadione cálcio no controle do desenvolvimento vegetativo de macieiras ‘Imperial Gala’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.4, p.957-963, 2012.

HAWERROTH, J.F. **Uso de fitorreguladores para controle do desenvolvimento vegetativo e aumento da frutificação em macieira e pereira**. 2010. 155p. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

JOHNSON, C.M.; ULRICH, A. **Analytical methods for use in plant analysis**. Bulletin 766. Agricultural Experiment Station, University of California, Berkeley, CA, 1959. 54p.

KASAI, S.; HAYAMA, H.; KASHIMURA, Y.; KUDO, S.; OSANAI, Y. Relationship between fruit cracking and expression of the expansin gene MdEXPA3 in ‘Fuji’ apples (*Malus domestica* Borkh.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.116, n.2, p.194-198, 2008.

KETSA, S.; DAENKANIT, T. Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase, b-galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.80, n.3-4, p.181-188. 1999.

KONG, M.; LAMPINEN, B.; SHACKEL, K.; CRISOSTO, C.H. Fruit skin side cracking and ostiole-end splitting shorten postharvest life in fresh figs (*Ficus carica* L.), but are reduced by deficit irrigation. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.85, p.154-161, 2013.

KUPFERMAN, E.M. Maturity and storage of Gala, Fuji and Braeburn apples. **Tree fruit Postharvest Journal**, Washington, v.5, n.3, p.10-15, 1994.

LAKSO, A.N.; GRAPADELLI, L.C.; BERNARD, J.; GOFFINET, M.C. An exponential model of the growth pattern of the apple fruit. **Journal of Horticultural Science**, Bangalore, v.70, n.4, p.389-394, 1995.

LAKSO A.N; GOFFINET M.C. Apple Fruit Growth. **New York fruit Quarterly**, New York, v.21, n.1, p.11-14, 2013.

LI, J.; YU, X.; LOU, Y.; WANG, L.; SLOVIN, J. P.; XU, W.; WANG, S.; ZHANG, C. Proteomic analysis of the effects of gibberellin on increased fruit sink strength in Asian pear (*Pyrus pyrifolia*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.195, p.25-36, 2015.

MAJUMDER, K.; MAZUMDAR, B.C. Changes of pectic substances in developing fruits of cape-gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in relation to the enzyme activity and evolution

of ethylene. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.96, n.1-4, p.91-101, 2002.

MARSCHNER, P. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3^a edição. Oxford: United Kingdom, 2012, 651p.

MARTÍNEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; AÑÓN, M.C. Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase, and peroxidase activities during ripening of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Journal Plant Growth Regulation**, New York, v.15, n.3, p.139-146, 1996.

MEDJDOUB, R.; BLANCO, V.J.A. Prohexadione-Ca inhibits vegetative growth of 'Smoothie Golden Delicious' apple trees. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.101, n.3, p.243-253, 2004.

MEDJDOUB, R.; VAL, J.; BLANKO, A. Inhibition of vegetative growth in red apple cultivars using prohexadione-calcium. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Clinton, v.80, n.2, p.263-271, 2005.

MEYER, G.A.; KELIHER, P.N. An overview of analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. In: Montaser, A., Golightly, D.W. (Eds.) **Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry**. VCH Publishers, New York, NY, 1992. v.2, p.473-516.

MIEDES, E.; LORENCES, E. P. Apple (*Malus domestica*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Fruits Cell-Wall Hemicelluloses and Xyloglucan Degradation during *Penicillium expansum* Infection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.52, p.7957-7963, 2004.

MIN, X.J.; BARTHOLOMEW, D.P. Effect of plant growth regulators on ethylene production, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity, and initiation of inflorescence development of pineapple. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.15, p.121-128, 1996.

MIQUELOTO, A.; AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.; SANTOS, A.; MITCHAM, E. Relationship between xylem functionality, calcium content and the incidence of bitter pit in apple fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.165, p.319–323, 2014.

MOGGIA C.; MOYA-LEÓN, M.A.; PEREIRA, M.; YURI, J.A.; LOBOS, G.A. Effect of DPA and 1-MCP on chemical compounds related to superficial scald of Granny Smith apples. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v.8, n.1, p.178-187, 2010.

MONTANARO, G.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C.; CELANO, G. Light influences transpiration and calcium accumulation in fruit of kiwifruit plants (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). **Plant Science**, New York, v.170, n.4, p.520-527, 2006.

MONTANARO, G.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C. Significance of fruit transpiration on calcium nutrition in developing apricot fruit. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Giessen, v.173, n.4, p.618-622, 2010.

NAKAGAWA, S.; BUKOVAC, M.J.; HIRATAI, N.; KUROOKAI H. Morphological studies of gibberellin-induced parthenocarpic and asymmetric growth in apple and Japanese pear fruits. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.37, n.1, p.9-18, 1967.

NICOLAS, J.J.; RICHARD-FORGET, F.; GOUPY, P.; AMIOT, M.J.; ALBERT, S. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Review of Food Science Nutrition**, Oklahoma, v.34, n.2, p.109-157, 1994.

NJOROGE, C.K.; KERBEL, E.L.; BRISKIN, D.P. Effect of calcium and calmodulin antagonists on ethylene biosynthesis in tomato fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Salt Lake City, v.76, n.2, p.209-214, 1998.

PEET, M.M. Fruit cracking in tomato. **HorTechnology**, Chicago, v.2, n.2, p.216-223, 1992.

PEREIRA, L.B.; SIMIONI, F.J.; CARIO, S.A.F. Evolução da produção de maçã em Santa Catarina: novas estratégias em busca de maior competitividade. **Revista Ensaios FEE**, Porto Alegre, v.31, n.1, p.209-234, 2010.

PESI, E.; FUCHS, Y.; ZAUBERMAN, G. Starch content and amylase activity in avocado fruit pulp. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Salt Lake, v.103, n.5, p.673-676, 1978.

PESIS, E.; IBÁÑEZ, A.M.; PHU, M.L.; MITCHAM, E.J.; EBELER, S.E.; DANDEKAR, A.M. Superficial scald and bitter pit development in cold-stored transgenic apples suppressed for ethylene biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.57, n.7, p.2786-2792, 2009.

POOVAIAH, B.W.; GLENN, G.M.; REDDY, A.S.N. Calcium and fruit softening: physiology and biochemistry. **Horticulture Review**, Milton, v.10, p.107-151, 1988.

RADEMACHER, W. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathway. **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.51, p.501-531, 2000.

RAMÍREZ, H.; GÁMEZ, B.H.; MENDOZA, A.B.; ARRIOJA, J.H.R.; MARES, V.A.; RAMÍREZ, C.A.; OSORIO, A.M. Prohexadiona de calcio incrementa la capacidad antioxidante, el contenido de licopeno y la actividad enzimática en frutos de tomate floradade. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, Chapingo, v.16, n.3, p.155-160, 2010.

RAO, M.V.; WATKINS, C.B.; BROWN, S.K; WEEDEN, N.F. Active oxygen species in 'White Angel' x 'Rome Beauty' apple selection resistant and susceptible to superficial scald. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.123, n.2, p.299-304, 1998.

SALTVEIT, M.E. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.15, n.3, p.279-292, 1999.

SALTVEIT, M.E. The rate of ion leakage from chilling-sensitive tissue does not immediately increase upon exposure to chilling temperatures. **Postharvest Biology Technology**, Amsterdam, v.26, n.1 p.295-304, 2002.

SAS INSTITUTE. **Getting started with the SAS learning edition**. Cary: SAS, 2009. 200p.

SAURE, M.C. Calcium translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.105, n.1, p.65-89, 2005.

SAURE, M.C. External control of anthocyanin formation in apple. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.42, n.1, p.181-218, 1990.

SCHMIDT, T.R.; ELFVING, D.C.; McFERSON, J.R.; WHITING, M.D. Gibberellic acid accelerates ‘Honeycrisp’, but not ‘Cameo’, apple fruit maturation. **HortTechnology**, Chicago, v.18, n.1, p.39-44, 2008.

SHAPIRO S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Southfield, v.52, n.4, p.591-611, 1965.

SILVEIRA, J.P.G.; AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.A.; CORREA, T.R.C.; PAES, F.N. Potencial produtivo e qualidade de frutos de macieiras tratadas com giberelina e inibidor da biossíntese de giberelinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.36, n.4, p.771-779, 2014.

SILVEIRA, J.P.G.; AMARANTE, C.V.T.; STEFFENS, C.A.; MIQUELOTO, A.; KATSURAYAMA, J.M. A inibição na síntese de giberelina reduz o crescimento vegetativo em macieiras e proporciona controle de “bitter pit” nos frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.2, p.328-335, 2012.

SKOBEL, E.; KAMMERMEIER, H.; ABDALLAH, A.Y.; GIL, M.I.; BIASI, W.; MITCHAM, E.J. Inhibition of superficial scald in apples by wounding: changes in lipids and phenolics. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.12, n.3, p.203-212, 1997.

SMIT, M.; MEINTJES, J.J.; JACOBS, G.; STASSEN, P.J.C.; THERON, K.I. Shoot growth control of pear trees (*Pyrus*

communis L.) with prohexadione-calcium. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.106, n.4, p.515-529, 2005.

SPINELLI, F.; RADEMACHER, W.; SABATINI, E.; COSTA, G. Reduction of scab incidence (*Venturia inaequalis*) in apple with prohexadione-Ca and trinexapac-ethyl, two growth regulating acylcyclohexanediones. **Crop Protection**, Surrey, v.29, n.7, p.691-698, 2010.

STEFFENS, C.A.; AMARANTE, C.V.T.; CHECHI, R.; SILVEIRA, J.P.G.; BRACKMANN, A. Aplicação pré-colheita de reguladores vegetais visando a retardar a maturação de ameixas 'Laetitia'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, p.1369-1373, 2009.

STEFFENS, C.A.; AMARANTE, C.V.T.; CHECHI, R.; SILVEIRA, J.P.G.; CORREA, T. R. Maturação e qualidade pós-colheita de ameixas 'Laetitia' com a aplicação pré-colheita de AVG e GA₃. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.1, p. 21-31, 2011.

SUN, T. Gibberellin signal transduction in stem elongation & leaf growth. **Plant Hormones**, New York, v.31, n.1, p.308-328, 2010.

TEDESCO, M.J; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise do solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

TROMP, J.; OELE, J. Shoot growth and mineral composition of leaves and fruits of apple as affected by relative humidity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.27, n.2, p.253-258, 1972.

WANG, H.; QIAN, Z.; MA, S.; ZHOU, Y.; PATRICK, J.W.; DUAN, X.; JIANG, Y.; QU, H. Energy status of ripening and postharvest senescent fruit of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). **BMC Plant Biology**, New York, v.13, n.55, p.2-16, 2013.

WHALE, S. K.; SINGH, Z. Endogenous ethylene and color development in the skin of 'Pink lady' apple. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Salt Lake City, v.132, n.1, p.20-28, 2007.

WHITAKER, B.D. Oxidative stress and superficial scald of apple fruit. **HortScience**, Palo Alto, v.39, n.5, p.933-937, 2004.

WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, Bristol, v.92, n.4, p.487-511, 2003.