

(S2-P15)

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE INDUZIDO POR ALTAS CONCENTRAÇÕES DE CO₂ EM MAÇÃ, ATRAVÉS DO MÉTODO DE FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILAS

**DANIEL ALEXANDRE NEUWALD^(1,4), IVAN SESTARI⁽²⁾, ADRIANO ARRIEL
SAQUET⁽³⁾, AURI BRACKMANN⁽⁴⁾ e JOSEF STREIF⁽¹⁾**

⁽¹⁾Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee (KOB), Schuhmacherhof 6, D-88213 Ravensburg,
Alemanha, daneuwald@yahoo.com.br

⁽²⁾Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- USP/ESALQ, Depto.
de Ciências Biológicas, Av. Pádua Dias, n° 11, 13419-000 Piracicaba, SP, Brasil,
isestari@esalq.usp.br

⁽³⁾Centro Federal de Educação Tecnológica de São Vicente do Sul (CEFET-SVS), Rua 20 de Setembro
s/n, 97420-000 São Vicente do Sul, RS, Brasil, adrianosaquet@hotmail.com

⁽⁴⁾Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Fitotecnia, 97105-900 Santa Maria, RS,
Brasil, brackman@ccr.ufsm.br

Palavras chave: distúrbios fisiológicos – previsão - pós-colheita – maçã - fluorescência de clorofilas

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar o método da fluorescência de clorofilas para detectar o estresse induzido em maçã, cultivar ‘Braeburn’, através de altas concentrações de CO₂. As medições da fluorescência de clorofilas foram feitas com auxílio de um fluorímetro do tipo PAM (Pulse Amplitude Modulation, Alemanha). Previamente às análises, as maçãs permaneceram três horas num ambiente escuro para adaptação dos fotossistemas. Logo em seguida, foram realizadas as medições iniciais de emissão de fluorescência das clorofilas. Os frutos foram armazenados nas seguintes concentrações de CO₂ por 24 horas: 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30kPa de CO₂. Após este período foi medido novamente a fluorescência de clorofilas. Todas as análises foram realizadas à temperatura de 20°C. As avaliações foram realizadas em três épocas: na colheita dos frutos, uma e duas semanas após a colheita. Com relação aos resultados obtidos foi possível verificar que, quanto maior a concentração de CO₂, menor o valor (Fv:Fm) que representa o rendimento potencial quântico, considerado como indicador de estresse na maçã. Foi possível observar também que, o estresse provocado pelo CO₂ nos frutos é reversível, pois os frutos permanecendo em atmosfera normal e então realizada nova medição da fluorescência de clorofilas, antes de uma nova aplicação de CO₂, os valores (Fv:Fm) foram similares para todas as condições. No entanto, os valores obtidos nas avaliações subsequentes foram menores que os anteriores, provavelmente, pela degradação das clorofilas. À medida que o fruto foi amadurecendo, o grau de estresse foi maior, ou seja, a diferença entre os valores (Fv:Fm) foram maiores nas avaliações após uma e duas semanas, em relação à época da colheita. Com estes resultados, pode-se buscar no futuro uma forma para previsão de certos distúrbios fisiológicos que, normalmente, ocorrem durante o armazenamento de maçãs em atmosfera controlada causados pelo uso de CO₂ neste sistema de armazenamento.

ASSESSMENT OF STRESS INDUCED BY HIGH CO₂ CONCENTRATIONS ON APPLES BY THE CHLOROPHYLL FLUORESCENCE TECHNIQUE

Keyword: physiological disorders, prediction, post-harvest, apple, chlorophyll fluorescence

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the chlorophyll fluorescence emission as a tool to detect the stress induced in 'Braeburn' apples after fruits have been exposed to high CO₂ partial pressures. Chlorophyll fluorescence measurements were performed with a PAM (Pulse Amplitude Modulation, Germany) fluorometer. Previously to measurements, fruits were kept in the darkness for three hours in order to adapt the photosystems. Apples were then stored for 24 h under the following CO₂ partial pressures for stress induction: 0; 5; 10; 15; 20; 25 and 30 kPa CO₂. Afterthat, chlorophyll fluorescence emission was analyzed again. All fluorescence measurements were performed at 20°C. The evaluations were done at harvest, one week and two weeks later. The results show that, the higher the CO₂ partial pressures, the smaller the Fv:Fm quantum yield value, that is considered as a stress indicator in apples. The CO₂ induced stress appears to be reversible, then when apples exposed to higher CO₂ concentrations returned to a normal atmosphere they showed similar Fv:Fm values. However, the values assessed at each subsequent evaluation were lower than the previously observed, probably due to chlorophyll degradation. Fv:Fm values increased with fruit ripening, as shown by the evaluations carried out at one and two weeks after harvest, when the stress was greater and the Fv:Fm values were higher. Our results showed that chlorophyll fluorescence is a potential tool to predict some CO₂ related physiological disorders which occur during controlled atmosphere storage of 'Braeburn' apples.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um incremento significativo no período de conservação de frutos climatéricos através da utilização do 1-Metilciclopropeno (1-MCP), sendo também, associado a formas de armazenamento mais antigas como a refrigeração e a utilização de atmosfera controlada (AC) (Prange et al. 2005; Gasser et al. 2006). O mecanismo de ação se dá através da ligação do MCP aos receptores de etileno, inibindo o processo de amadurecimento dos frutos. No entanto, com a tendência mundial em consumir produtos com menores concentrações de produtos químicos, essa tecnologia enfrenta algumas restrições as quais devem aumentar no futuro. Neste contexto, a fluorescência de clorofilas leva vantagem em sua utilização, pois é um processo físico que visa avaliar indiretamente as condições dos frutos durante o armazenamento. Essa tecnologia começou a ser relatada na literatura a partir de 1994 (Lurie et al. 1994). Esses autores explicam como a fluorescência de clorofilas pode funcionar como um método de avaliação de estresse e assim, pode ser utilizada em tecidos vegetais verdes, ou seja, que contenham clorofila, sendo também um método não destrutivo para avaliação da qualidade de frutos. O possível mecanismo que explica como a fluorescência de clorofilas detecta o estresse e injúrias celulares é que, quando se ilumina a clorofila, esta emite fluorescência vermelha que é responsável pela ativação do fotossistema II, assim um estresse que direta ou indiretamente afeta o metabolismo fotossintético vai proporcionar uma mudança na fluorescência quando aplicada neste tecido(Lurie et al. 1994).

Essa técnica além de ser utilizada para detectar o estresse em plantas, tem recebido uma atenção especial para melhoria das condições de armazenamento, em especial associado a AC que proporcionam melhorias nas qualidades físico-químicas de frutas e vegetais por

evitar o estresse por condições de gases inapropriadas durante o armazenamento (Toivonen & DeEll, 2001; Prange et al., 2002; Prange et al., 2003; Veltman et al., 2003; Prange et al., 2005; Gasser et al., 2006). Sendo que já tem sido desenvolvido equipamentos para o monitoramento comercial de câmaras de AC (Prange et al., 2006). Outra utilização do método de fluorescência de clorofila é para detectar injúrias pelo frio em frutas e vegetais durante o armazenamento (Smillie et al., 1987; Lurie et al., 1994). Mais recentemente Saquet & Streif (2002) sugerem que essa técnica pode ser promissora para a previsão (prognose) ou até mesmo a detecção de distúrbios fisiológicos causados por baixo O₂ ou por alto CO₂. Desta forma, o trabalho teve como objetivo avaliar o método da fluorescência de clorofilas para detectar o estresse induzido em frutos de maçã, cultivar 'Braeburn', através de altas concentrações de CO₂.

MATERIAL E MÉTODOS

O Experimento foi conduzido no "Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee" (KOB), em Bavendorf, uma fundação da Universität Hohenheim. O material experimental usado foi a maçã cultivar Braeburn sendo os frutos provenientes do pomar do próprio KOB, localizado no município de Ravensburg, Alemanha (latitude 47°47'00"N, longitude 9°37'00"E, 470 a 500 metros de altitude). O experimento teve os seguintes tratamentos: 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30kPa de CO₂. No dia da colheita, foi medido, individualmente, a fluorescência de clorofila em 15 frutos de cada tratamento (estresse com CO₂), no lado verde e amarelo do fruto. Estes 15 frutos foram agrupados em três repetições de 5 frutos cada.

A medição da fluorescência de clorofilas emitida pelos frutos foi realizada conforme descrito por Saquet & Streif, (2002); Toivonen & DeEll (2001) através de um fluorímetro portátil do tipo PAM ('pulse amplitude modulation', marca Walz, Alemanha) equipado com fibras óticas com 1 cm de diâmetro. Previamente à leitura, os frutos foram adaptados em câmara com temperatura controlada e ambiente escuro durante três horas. Os valores dos parâmetros de Fo, Fm e o coeficiente Fv:Fm foram determinados com a fibra ótica a uma distância de 1 cm da superfície do fruto. Sendo que Fo é a fluorescência mínima (escuro), Fm é a fluorescência máxima (escuro) e Fv = Fm - Fo, dessa forma Fv:Fm = (Fm-Fo):Fm que representa o rendimento potencial quântico, considerado como indicativo de estresse nos frutos.

As medições da fluorescência de clorofilas foram realizadas na colheita, após uma semana e duas semanas de climatização dos frutos a 20°C e após 24h em que os frutos permaneceram em atmosfera com alto CO₂. O estresse nos frutos foi considerado como a diferença das medições entre a avaliação antes da aplicação de CO₂ e a avaliação posterior a esta aplicação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação aos resultados obtidos é possível verificar, na Figura 1, que quanto maior a concentração de CO₂ usada, menor é o valor de Fv:Fm, o qual representa o rendimento potencial quântico, considerado como indicador de estresse na maçã. Prange et al. (2005) afirmam que baixas pressões parciais de O₂ e altas pressões parciais de CO₂ provocam o estresse nos frutos e podem ser detectados pelo método de fluorescência de clorofila, através do coeficiente Fv:Fm que diminui à medida que o O₂ diminui ou que o CO₂ aumenta. Resultado de Saquet & Streif (2002) concordam com os obtidos neste trabalho, pois verificaram em pera 'Conference' que frutos armazenados em alto CO₂ apresentam menores valores de rendimento potencial quântico até o terceiro mes de armazenamento.

Foi possível observar também que, o estresse provocado pelo CO₂ nos frutos, é reversível (Figura 1). Os frutos após o estresse causado pelas altas pressões parciais de CO₂ permanecendo em atmosfera normal e então realizada nova medição da fluorescência de clorofilas, antes de uma nova aplicação de CO₂, os valores Fv:Fm foram similares para todas as condições. Estes resultados estão parcialmente de acordo com os obtidos por Prange et al. (2002); Prange et al. (2003); Prange et al. (2005); Gasser et al. (2006) que avaliaram o estresse nos frutos através de baixas concentrações de O₂. Também verificaram que, com o aumento das pressões parciais de O₂, após o estresse, os valores de Fv:Fm também aumentaram, demonstrando que o estresse é reversível. Embora o mecanismo seja diferente, Veltman et al. (2003) utilizando a produção de etanol como parâmetro para avaliação do grau de estresse provocado por condições inadequadas de armazenamento, também verificaram a reversibilidade do estresse em função das baixas pressões parciais de O₂. No entanto, os valores obtidos nas avaliações subseqüentes, no presente trabalho, ou seja, na primeira e segunda semana após a colheita foram menores que os avaliados na época da colheita (Figura 1), possivelmente, pela degradação das clorofilas, processo natural que faz parte do amadurecimento de frutos (Song et al., 1997; Stoll, 1997; Taiz & Zeiger, 2004; Chitarra & Chitarra, 2005). Saquet & Streif (2002) também observaram para maçã e pera que com o avanço do período de armazenamento dos frutos os valores Fv:Fm são paulatinamente menores até o final deste período, ou seja, ocorre um decréscimo dos valores Fv:Fm durante a maturação até a senescência do fruto.

À medida que o fruto foi amadurecendo, maior foi o grau de estresse detectado, ou seja, a diferença entre os valores Fv:Fm foram maiores nas avaliações após uma e duas semanas, em relação à época da colheita, conforme pode ser observado nas Figuras 1 e 2. Saquet & Streif (2002) verificaram em maçã e pêra armazenadas em AR, após 3 meses de armazenamento, acentuado decréscimo nos valores de Fv:Fm, possivelmente relacionado ao processo de senescência dos frutos.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados, podemos concluir que, a técnica da fluorescência de clorofilas é um método que pode ser usado para determinar grau de estresse em maçãs 'Braeburn' provocado por altas pressões parciais de CO₂.

Desta forma, pode-se buscar no futuro, uma forma para previsão de certos distúrbios fisiológicos que, normalmente, ocorrem durante o armazenamento de maçãs em atmosfera controlada causados pelo uso de CO₂ neste sistema de armazenamento, mas para isso é necessário validar este método em experimentos futuros.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Brasilien-Zentrum, pelo fomento e possibilidade da realização do intercâmbio internacional (doutorado-sanduíche) do primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de estudo, também ao primeiro autor nos estudos realizados no Brasil. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa ao segundo autor.

BIBLIOGRAFÍA

Chitarra, M. I. F. & Chitarra, A. B. 2005. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2 ed. rev. e ampl. Lavras, UFLA. 785 p.

- Gasser, F. ; Höhn, E.; Streif, J. Kittermann, D. 2006. Aktuelle lagertechnische Themen. Obst und Weinbau. 26:12-13.
- Lurie, S. ; Ronen, R. ; Meier, S. 1994, Determining Chilling injury induction in green peppers using nondestructive pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. 119(1):59-62.
- Prange, R. K. ; DeLong, J. M.;Leyte, J. C.; Harrison, P. A. 2002. Oxygen concentration affects chlorophyll fluorescence in Chlorophyll-containing fruit. Postharvest Biology and Technology. 24:201-205.
- Prange, R. K. ; DeLong, J. M.; Harrison, P. A. 2003. Oxygen concentration affects chlorophyll fluorescence in Chlorophyll-containing fruit and vegetables. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128(4):603-607.
- Prange, R. K. ; DeLong, J. M.; DeLong, J. M.; Daniels-Lake, B. J.; Harrison, P. A. 2005. Innovation in controlled atmosphere technology. Stewart Postharvest Review 3(9):1-11.
- Saquet, A. A. & Streif, J. 2002. Chlorophyll fluorescence as a predictive method for detection of browning disorders in 'Conference' pears and 'Jonagold' apples during controlled atmosphere storage. Ciência Rural. 32(4):571-576.
- Smillie, R. M.; Hetherington, S. E.; Nott, R.; et al. 1987. Application of chlorophyll fluorescence to the postharvest physiology and storage of mango and banana fruit and the chilling tolerance of mango cultivars. Asean Food Journal. 3:55-59.
- Song, J., Deng, W. Beaudry, R. M. et al. 1997. Changes in chlorophyll fluorescence of apple fruit during maturation, ripening and senescence. HortScience. 32:891-896.
- Stoll, K. 1997. Der Apfel Enrico Negri AG, Buch- und Offsetdruckerein, Zürich. 303pp.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3 ed. Artmed, Porto Alegre. 719pp.
- Toivone, P. M. A. & DeEll, J. R. 2001. Chlorophyll fluorescence, fermentation product accumulation, and quality of stored broccolis in modified atmosphere packages and subsequent air storage. Postharvest Biology and Technology. 23: 61-69.
- Veltman, R. H.; Verschoor, J. A.; Ruijsch van Dugteren, J. H. 2003. Dynamic control system (DCS) for apples (*Malus domestica* Borkh. cv 'Elstar'): optimal quality trough storage based on product response. Postharvest Biology and Technology. 27: 79-86.

TABELAS Y FIGURAS

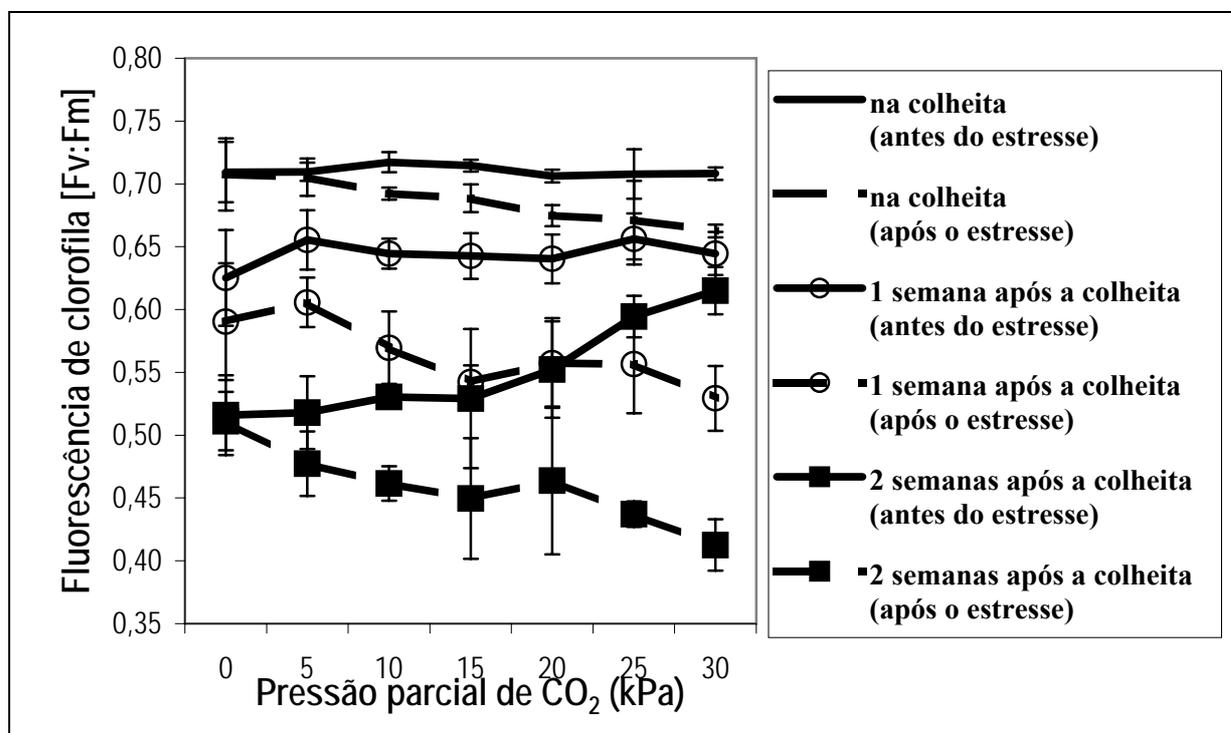


Figura 1. Fluorescência de clorofilas em maçã 'Braeburn' em diferentes concentrações de CO₂ e épocas de avaliações. KOB-Bavendorf, Ravensburg, Alemanha, 2006.

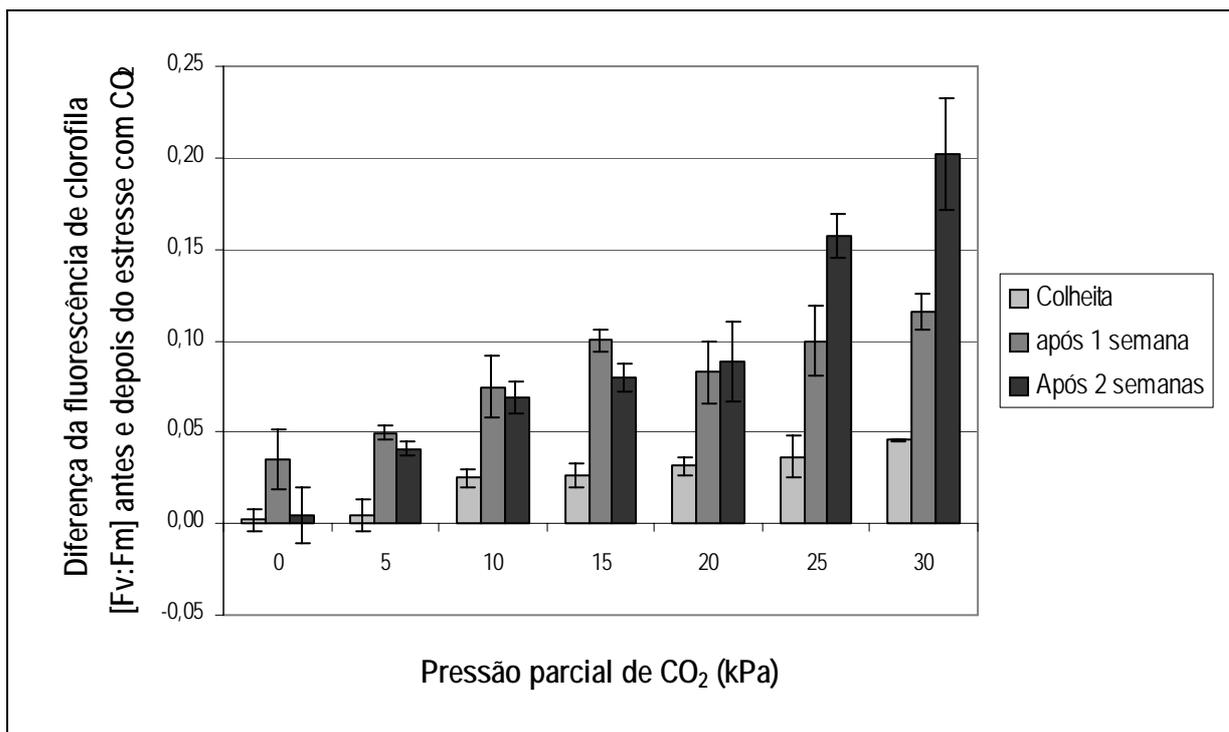


Figura 2. Diferença na fluorescência de clorofila (Fv:Fm) antes e após a aplicação do estresse com diferentes concentrações de CO₂ e épocas de avaliações, em maçã 'Braeburn'. KOB-Bavendorf, Ravensburg, Alemanha, 2006.