

Lanosidade em cultivares de pêsego (*Prunus persica* (L.) Batsch): estudos anatômicos e ultra-estruturais

BEATRIZ APPEZZATO-DA-GLÓRIA^{1,3}, ILANA U. BRON¹ e SILVIA R. MACHADO²

(recebido: 12 de junho de 2002; aceito: 23 de outubro de 2003)

ABSTRACT – (Peaches (*Prunus persica* (L.) Batsch) woolliness: anatomical and ultrastructural studies). In order to better understand the critical period and the cellular changes accompaniment chilling injury in peaches, two peaches cultivars were analysed: ‘Aurora-1’ (chilling non-sensitiv) and ‘Dourado-2’ (chilling sensitivy) during storage at 3 °C followed by two days at 25 °C (simulated commercialization). Analysis on light and electron microscope were performed. Mesocarp tissue and cell anatomy from freshly harvest peaches were similar and presented turgid isodiametric parenchyma cells with different sizes and conspicuous intercellular spaces. The fruit mesocarp from both cultivars were similar and almost unchanged during storage at 3 °C for 7, 14, 21, 28 e 35 days. But, ‘Dourado-2’ fruits when transfered to 25 °C for two days after cold storage at 3 °C, showed typical mealiness symptoms like cell walls separation leading to increased intercellular spaces and accumulation of pectic substances in the intercellular matrix. Nuclear fragmentation and macroendocytosis process by endosome individualization were described by the first time as related to chilling injury.

Key words - anatomy, cold storage, fruits, *Prunus persica*, ultrastructure

RESUMO – (Lanosidade em cultivares de pêsego (*Prunus persica* (L.) Batsch): estudos anatômicos e ultra-estruturais). A fim de detectar o período de manifestação dos sintomas de lanosidade e compreender melhor as alterações celulares que acompanham a injúria causada pelo frio, foram analisados dois cultivares de pêsegos: ‘Aurora-1’ (não sensível ao frio) e ‘Dourado-2’ (sensível ao frio), durante o armazenamento refrigerado a 3 °C seguido da comercialização simulada por dois dias a 25 °C. Foram feitas análises aos microscópios fotônico e eletrônico de transmissão. O mesocarpo dos pêsegos, no momento da colheita, foi anatomicamente similar e apresentou células parenquimáticas túrgidas isodiamétricas de tamanhos variáveis arranjadas com amplos espaços intercelulares. O mesocarpo dos frutos de ambos cultivares permaneceu praticamente inalterado durante o armazenamento a 3 °C por 7, 14, 21, 28 e 35 dias. Porém, os frutos ‘Dourado-2’ quando transferidos para a temperatura de 25 °C por dois dias após o armazenamento refrigerado a 3 °C apresentaram, a partir do sétimo dia, sintomas típicos da lanosidade, ou seja, separação das paredes celulares adjacentes ampliando os espaços intercelulares que se tornavam preenchidos por substâncias pécticas. A fragmentação nuclear e o processo de macroendocitose com a individualização de endossomos foram descritos pela primeira vez como relacionados ao dano causado pelo frio.

Palavras-chave - anatomia, armazenamento refrigerado, frutos, *Prunus persica*, ultra-estrutura

Introdução

Em pêsegos, que têm alta perecibilidade e comportamento climatérico, o uso da refrigeração tem sido preconizado como método adequado de conservação, estendendo dessa forma o período de comercialização. Porém, o uso de temperaturas baixas durante o armazenamento pode causar distúrbios ou desordens fisiológicas, também conhecidas como “chilling” (Gottinari *et al.* 1998).

No pêsego o sintoma de “chilling” é caracterizado, principalmente, pela lanosidade (Luchsinger & Walsh

1998). A identificação da lanosidade é bastante problemática uma vez que não há diferenças visíveis entre frutos sadios e frutos lanosos; os sintomas são perceptíveis apenas quando o fruto é aberto, ou seja, o problema não é constatado até que o fruto chegue ao consumidor (Luchsinger & Walsh 1998).

A lanosidade é resultado do desbalanço na atividade de enzimas pectolíticas durante o amadurecimento, quando ocorre aumento da atividade da PME (pectinametilsterase), causando acúmulo de substâncias pécticas com baixo grau de esterificação e redução ou inibição da atividade da PG (poligalacturonase), não permitindo que essas substâncias sejam degradadas e solubilizadas (Ben-Arie & Sonogo 1980, Zhou *et al.* 2000). Essas substâncias pécticas com baixo grau de esterificação têm a capacidade de se ligar à água livre das células, formando gel, resultando dessa forma, na perda da suculência do fruto.

1. Universidade de São Paulo, Esalq, Departamento de Ciências Biológicas, Caixa Postal 09, 13418-900 Piracicaba, SP, Brasil.
2. Universidade Estadual Paulista, IB, Departamento de Botânica, Caixa Postal 510, 18618-000 Botucatu, SP, Brasil.
3. Autora para correspondência: bagloria@esalq.usp.br

A superação da lanosidade durante o amadurecimento pode ocorrer quando os frutos são transferidos para temperaturas mais altas (Von Mollendorff *et al.* 1992), pois a PG reassume sua atividade, resultando em substâncias pécticas de baixo peso molecular (Pressey & Avants 1973) que por sua vez não têm capacidade de formar gel. A água é liberada dos fragmentos pécticos, aumentando a suculência, e o distúrbio não é manifestado (Ben-Arie & Sonego 1980). Porém, existe um período crítico, durante o armazenamento refrigerado, acima do qual a atividade da PG é inibida de maneira irreversível, mesmo quando os frutos são transferidos para temperaturas mais altas. Neste contexto, as análises anatômicas ao longo do armazenamento podem ser úteis na identificação do período no qual os frutos começam a exibir os sintomas de ‘chilling’.

Anatomicamente, os sintomas de “chilling” em pêssegos se expressam através da expansão dos espaços intercelulares do mesocarpo, e acúmulo de substâncias pécticas de alto peso molecular na matriz intercelular (Luza *et al.* 1992, Brovelli *et al.* 1998).

A fim de detectar o período de manifestação dos sintomas de “chilling” e compreender melhor as alterações celulares que acompanham a injúria causada pelo frio, foram analisados dois cultivares de pêssegos: ‘Aurora-1’ (não sensível ao frio) e ‘Dourado-2’ (sensível ao frio), durante o armazenamento refrigerado a 3 °C seguido da comercialização simulada a 25 °C por dois dias.

Material e métodos

O experimento foi realizado nos Departamentos de Ciências Biológicas e Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, em Piracicaba-SP. Os pêssegos (*Prunus persica* (L.) Batsch) dos principais cultivares plantados no Estado de São Paulo: ‘Aurora-1’ e ‘Dourado-2’ foram colhidos em pomar comercial do município de Holambra II-SP. No momento da colheita, os frutos foram rigorosamente selecionados quanto ao estágio de amadurecimento (maturidade fisiológica), tamanho e ausência de defeitos. Imediatamente após a colheita, os frutos foram acondicionados em caixas de papelão e transportados até o Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP.

Foi estudada a temperatura de 3 °C em cinco períodos de armazenamento refrigerado (7, 14, 21, 28 e 35 dias). Cada parcela, com seis frutos, foi acondicionada em sacos de polietileno perfurados e armazenada em câmaras de refrigeração do tipo B.O.D, marca Marconi, modelo MA 415. Depois de retirados da câmara de refrigeração, os frutos, ainda embalados em sacos de polietileno, foram mantidos a 25 °C

por dois dias, com o objetivo de simular um período de comercialização.

Para a análise anatômica, amostras do mesocarpo dos frutos foram coletadas em três períodos: no momento da instalação do experimento (controle), na retirada da câmara de refrigeração e após cada período de comercialização simulada.

Amostras retangulares da porção mediana do mesocarpo foram retiradas paralelamente ao eixo longitudinal do fruto, na região de maior diâmetro, e mediam 5 × 5 mm no plano transversal e 3 mm no plano longitudinal.

Para cada período foram avaliadas duas amostras do mesocarpo de quatro frutos (1 fruto por parcela). As amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 4%, fosfato dipotássio 0,2 M, ácido cítrico monoidratado 0,1 M e 4% de sacarose, pH 7,0 (Luza *et al.* 1992). Para melhor fixação, as amostras foram submetidas a vácuo para retirada do ar dos espaços intercelulares. Seguiu-se a lavagem na solução tampão utilizada na fixação (à temperatura ambiente) e desidratação em série etílica, com a adição de 4% de sacarose até álcool 50%. A adição de sacarose ao fixador e ao álcool é realizada para que a concentração osmótica dessas soluções se aproxime àquela do tecido, uma vez que, por ser constituído de células altamente vacuoladas, este é bastante sensível à plasmólise.

As amostras desidratadas foram infiltradas com resina glicol metacrilato, seccionadas transversalmente com 5 µm de espessura, coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato e ácido cítrico (Sakai 1973) e montadas em resina sintética “Entellan”.

A análise ultra-estrutural foi conduzida apenas nos frutos ‘Dourado-2’, mantidos por 35 dias em câmara de refrigeração seguidos por dois dias a 25 °C (comercialização simulada). As amostras foram fixadas conforme descrito acima, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% preparado em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, desidratadas em série etílica e incluídas em Araldite (Silva & Machado 1999). As secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila (Watson 1958) e citrato de chumbo (Reynolds 1963) e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips TEM 100 operado a 80 kV.

Resultados e Discussão

O mesocarpo dos frutos de ‘Aurora-1’ e ‘Dourado-2’, no momento da colheita (controle), apresentam células parenquimáticas isodiamétricas de tamanhos distintos, túrgidas e de arranjo laxo. Entre as células parenquimáticas ocorrem feixes vasculares. O mesocarpo dos frutos ‘Aurora-1’ e ‘Dourado-2’ armazenados por 14, 21, 28 e 35 dias é muito semelhante ao controle, permanecendo praticamente inalterado durante o armazenamento a 3 °C (figura 1). Esse resultado indica que o metabolismo do fruto não sofre

alterações durante o período de armazenamento refrigerado e o sintoma de lanosidade não é observado.

Quando os frutos ‘Dourado-2’ são transferidos para temperaturas de 25 °C por dois dias após a remoção do armazenamento refrigerado a 3 °C (comercialização simulada), é possível identificar alguns sintomas típicos da lanosidade. Nos frutos armazenados por 7 + 2, 14 + 2 e 21 + 2 dias são observados acúmulos de substâncias pécticas nos espaços intercelulares e no interior das células parenquimáticas próximas aos feixes vasculares (figura 2).

Em frutos ‘Dourado-2’ conservados por 28 + 2 dias esse acúmulo não se mantém restrito às regiões próximas aos feixes, sendo observado por todo o mesocarpo. Algumas células parenquimáticas apresentam paredes muito sinuosas e/ou separação das paredes celulares adjacentes, ampliando os espaços intercelulares que são preenchidos por substâncias pécticas (figura 3). Aos 35 + 2 dias, o depósito de substâncias pécticas nos espaços intercelulares e no interior das células parenquimáticas se intensifica por todo o mesocarpo.

Nas células do mesocarpo de frutos ‘Dourado-2’ observa-se a fragmentação nuclear, a qual se intensifica durante a comercialização simulada após 28 e 35 dias de armazenamento a 3 °C (figura 4).

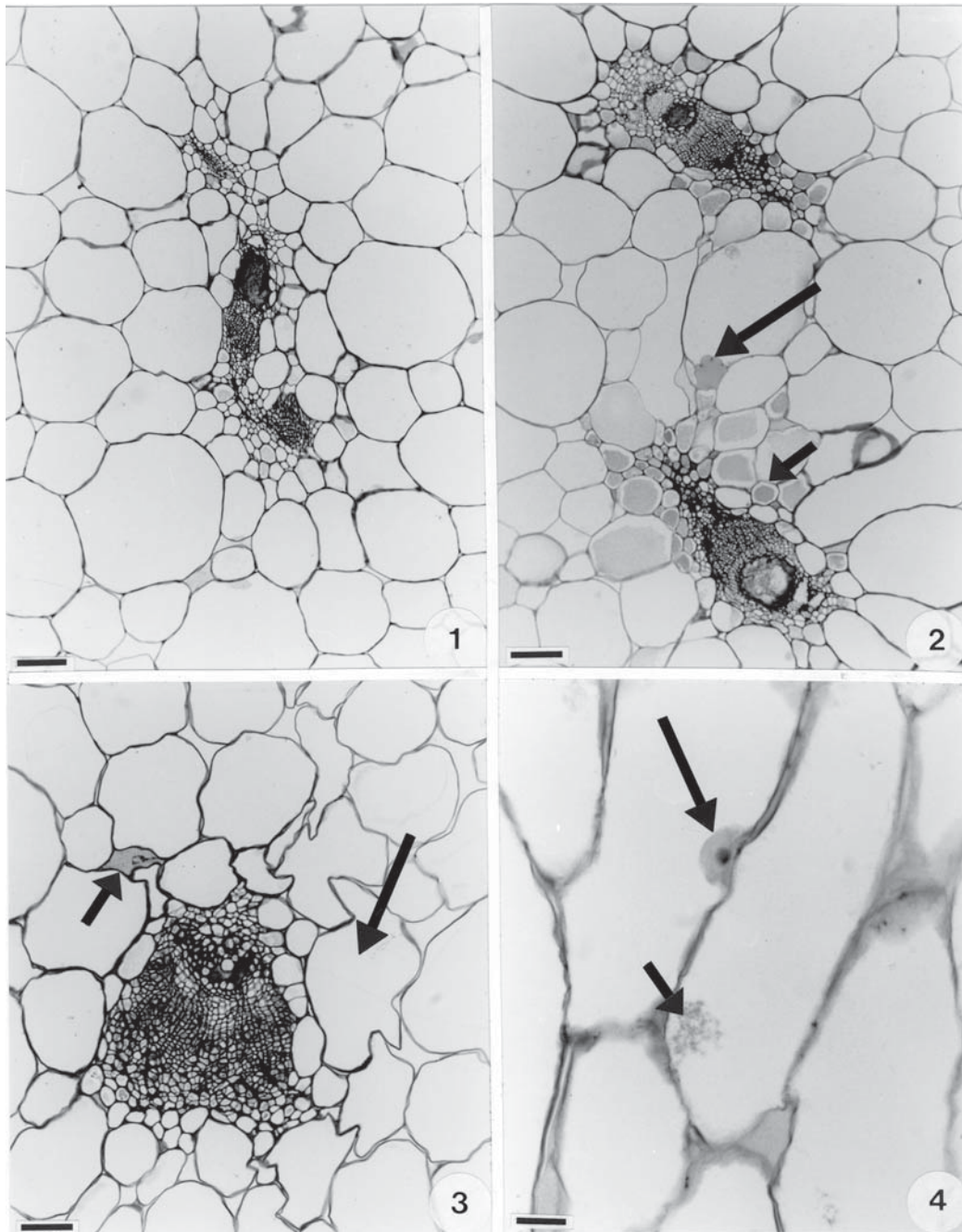
Uma vez que os sintomas de lanosidade apenas são observados em frutos de ‘Dourado-2’, armazenados por 7, 14, 21, 28 e 35 dias seguidos da comercialização simulada, a fragmentação nuclear pode ser consequência da exposição do fruto ao frio e, portanto, agravada pelo “chilling”. A ausência de lanosidade na cultivar ‘Aurora-1’, que apresenta fragmentação nuclear menos acentuada na comercialização simulada, reforça esta observação.

O mesocarpo dos frutos ‘Aurora-1’, na comercialização simulada, apresenta as mesmas características anatômicas verificadas durante o armazenamento refrigerado a 3 °C, não sendo observado acúmulo de substâncias pécticas no interior das células e nos espaços intercelulares e nem a separação da parede de células adjacentes, típicos sintomas de lanosidade exibidos pelos frutos ‘Dourado-2’.

Luza *et al.* (1992) e Brovelli *et al.* (1998), estudando as alterações anatômicas em cultivares de pêssegos com lanosidade, verificaram os mesmos tipos de alterações. Segundo esses autores, o mesocarpo dos frutos apresenta células de contorno irregular e perda da adesão entre paredes de células adjacentes levando à expansão dos espaços intercelulares que se tornam preenchidos por substâncias pécticas.

A análise ultra-estrutural do mesocarpo, de frutos ‘Dourado-2’ mantidos durante 35 dias a 3 °C seguidos de dois dias de comercialização simulada, complementou várias observações realizadas na microscopia fotônica. Entre elas, a presença de várias células com a carioteca desintegrada e o núcleo fragmentado (figura 6), ao lado de outras células com a carioteca e núcleo íntegro (figura 5). A fragmentação nuclear ainda não havia sido descrita como uma característica associada ao dano causado pelo frio, embora sua ocorrência seja frequentemente associada à senescência celular (Bhattacharya *et al.* 1996).

As alterações na parede celular nos frutos ‘Dourado-2’ são iniciadas pela dissolução da lamela mediana (figura 7) e separação das células adjacentes ampliando o espaço entre as mesmas; as paredes de células separadas muitas vezes apresentam sinuosidades (figura 8). Luza *et al.* (1992) também observaram que a exposição dos frutos de pêssegos ‘Fairtime’, ‘O’Henri’ e ‘Autumn Gem’ a baixas temperaturas provocam os sintomas de lanosidade (‘mealiness’), ou seja, a dissolução da lamela mediana, sinuosidades na parede primária e plasmólise de células do mesocarpo; entretanto, plasmólise não foi observada no material do presente estudo. Os autores distinguem ‘mealiness’ e ‘leatheriness’. Os frutos com ‘leatheriness’ apresentam textura coriácea e as alterações são mais drásticas quanto à sinuosidade das paredes, proporcionando um aspecto colapsado às células e o espessamento irregular da parede primária. Talvez o espessamento, referido por Luza *et al.* (1992), seja em decorrência do arranjo frouxo das fibrilas de celulose em função do processo de desestruturação da parede e não da síntese de novos materiais parietais como descrevem os autores. Uma outra alteração parietal, verificada em pêssegos ‘Dourado-2’ e não relatada por Luza *et al.* (1992), foi a gradual desintegração da estrutura fibrilar nas porções mais externas da parede subjacente à lamela mediana e que, também, leva à formação de espaços (figura 8), embora as porções mais internas da parede mantenham seu arranjo prévio. Também King *et al.* (1989), estudando frutos de nectarina ‘Fantasia’, sugerem que a lanosidade está associada à separação da lamela mediana sem uma degradação extensiva da parede celular. Processo similar foi descrito por Ben-Arie & Kislev (1979), para frutos de maçã e pêra, durante o amadurecimento. Segundo os autores, a persistência dos plasmodesmos na parede celular durante todo o processo de amadurecimento similar a de certas organelas, principalmente mitocôndrias, que persistem em tecidos de frutos senescentes, pode estar relacionada ao elevado



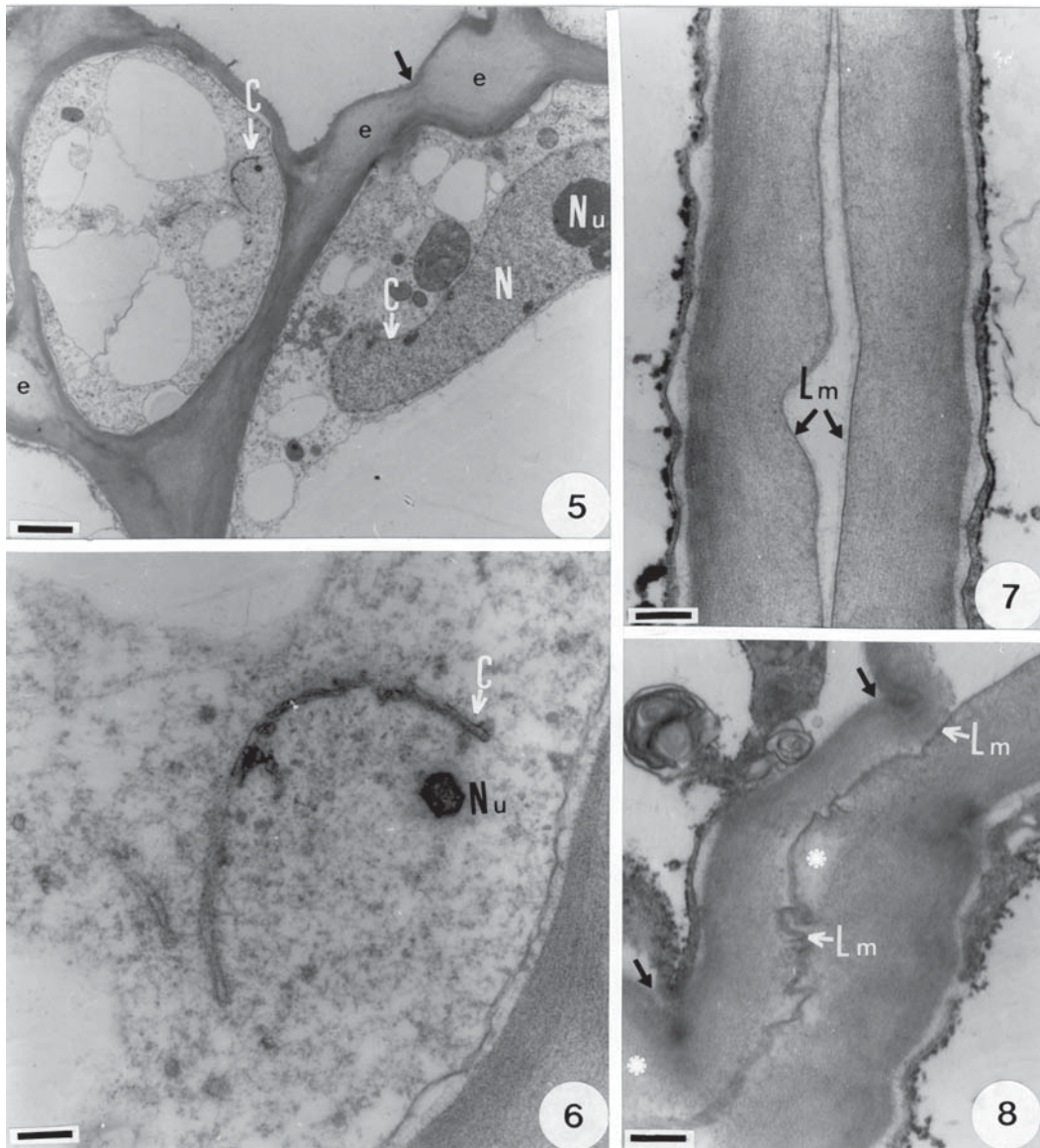
Figuras 1-4. Secções transversais do mesocarpo de pêsego ‘Dourado-2’ após diferentes dias de armazenamento a 3 °C (figura 1) e mais dois dias de comercialização simulada a 25 °C (figuras 2-4). 1. Após 35 dias, as células do mesocarpo não apresentam sintomas de lanosidade. 2. Após 14 dias, ocorre o depósito de substâncias pécnicas nos espaços intercelulares (seta maior) e no interior das células parenquimáticas (seta menor). 3. Após 28 dias, as células do mesocarpo exibem afastamento de paredes de células adjacentes, acúmulo de substâncias pécnicas nos espaços intercelulares (seta menor), e o contorno irregular das células (seta maior). 4. Após 35 dias, algumas células do mesocarpo exibem núcleo íntegro (seta maior) e outras fragmentação nuclear (seta menor). Barras = 74 µm (1, 2); 37µm (3); 19 µm (4).

Figures 1-4. Transections of ‘Dourado-2’ peaches mesocarp after different days of storage at 3 °C (figure 1) more two days at 25 °C of simulated commercialization (figures 2-4). 1. After 35 days, the mesocarp cells did not present woolliness symptoms. 2. After 14 days, the mesocarp exhibited pectin accumulation into intercellular spaces (bigger arrow) and parenchyma cells (smaller arrow). 3. After 28 days, the mesocarp exhibited separation of cell walls, pectin accumulation into intercellular spaces (smaller arrow) and sinuous cell walls (bigger arrow). 4. After 35 days, some mesocarp cells exhibited intact nucleus (bigger arrow) or nuclear fragmentation (smaller arrow). Bars = 74 µm (1, 2); 37µm (3); 19 µm (4).

metabolismo das células. Tais características são observadas, também, nos frutos analisados nesse estudo (figuras 9, 10).

Outra característica marcante, observada nos frutos de pêsegos 'Dourado-2', é a extensiva

invaginação da membrana plasmática e a presença de substâncias parietais residuais no interior dessas invaginações (figuras 10, 12). Em algumas células foi possível verificar estruturas vesiculares dispersas no citoplasma e no interior do vacúolo (figura 11) contendo

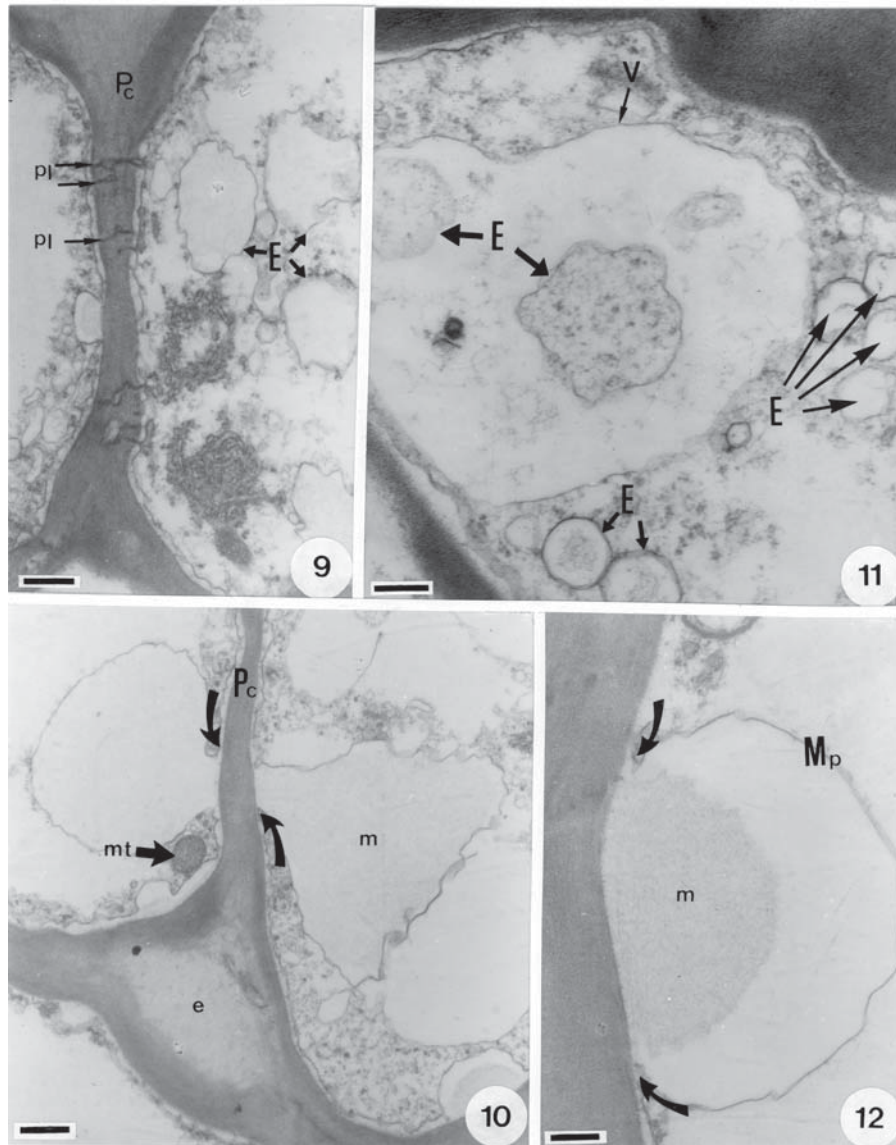


Figuras 5-8. Eléctron-micrografias de células do mesocarpo de pêsego 'Dourado-2' após 35 dias a 3 °C, seguido de dois dias de comercialização simulada a 25 °C. 5. Núcleo (N) e nucléolo (Nu) íntegros; formação de espaços intercelulares (e); envelope nuclear desintegrado (C). 6. Detalhe do envelope nuclear (C) desintegrado. 7. Dissolução da lamela mediana (Lm) entre as paredes de células adjacentes levando à formação de espaços intercelulares. 8. Desestruturação das fibrilas na porção mais externa da parede primária (*), dissolução da lamela mediana (Lm) e sinuosidades da parede (setas). Barras = 0,12 µm (5); 0,02 µm (6); 0,03 µm (7); 0,04µm (8).

Figures 5-8. Electron micrographs of 'Dourado-2' peaches mesocarp after 35 days of storage at 3 °C more two days at 25 °C of simulated commercialization. 5. Intact nucleus (N) and nucleolus (Nu); separation of the cell walls leading to intercellular space (e) formation; nuclear membrane fragmentation (C). 6. Detail of nuclear membrane fragmentation (C). 7. Middle lamella dissolution (Lm) in neighboring cell walls and intercellular spaces formation. 8. Microfibrils disorganization in the outer portion of the primary wall (*), middle lamella dissolution (Lm) and sinuous cell wall (arrows). Bars = 0.12 µm (5); 0.02 µm (6); 0.03 µm (7); 0.04µm (8).

tais substâncias. Batisse *et al.* (1996) descrevem um processo similar em frutos de cereja durante o amadurecimento e o denominam de macroendocitose. A diferença entre os dois processos está no fato de que, em pêsegos ‘Dourado-2’, não se observa a

formação de ‘vesículas’ no espaço parietal como os autores ilustram em cereja. Porém, nos frutos estudados, a presença de vesículas (endossomos) de diferentes tamanhos no citoplasma e no vacúolo, contendo substância parietal, pode estar relacionada à



Figuras 9-12. Elétron-micrografias de células do mesocarpo de pêsego ‘Dourado-2’ após diferentes dias de armazenamento a 3 °C seguido de 2 dias de comercialização simulada a 25 °C. 9. Presença de plasmodesmos (pl) nas paredes (Pc) de células adjacentes e de endossomos (E). 10. Dissolução da lamela mediana entre as paredes (Pc) de células adjacentes levando à formação de espaços intercelulares (e), presença de mitocôndria (mt) e invaginações (setas) da membrana plasmática preenchidas com material parietal (m). 11. Presença de endossomos (E) no citoplasma e no interior do vacúolo (V). 12. Invaginação (setas) da membrana plasmática (Mp) e presença de material parietal (m). Barras = 0,04 µm (9); 0,06 µm (10); 0,02 µm (11); 0,03 µm (12).

Figures 9-12. Electron micrographs of ‘Dourado-2’ peaches mesocarp after different days of storage at 3 °C more two days at 25 °C of simulated commercialization. 9. Plasmodesmata (pl) between neighboring cell wall (Pc) and endosome (E). 10. Middle lamella dissolution in neighboring cell walls (Pc) leading to intercellular spaces formation (e), mitochondrion (mt) and plasma membrane invaginations (arrows) filled with wall substances (m). 11. Endosomes (E) in the cytoplasm and into vacuole (V). 12. Presence of wall substances (m) into plasma membrane (Mp) invagination (arrows). Bars = 0.04 µm (9); 0.06 µm (10); 0.02 µm (11); 0.03 µm (12).

eliminação dos produtos residuais originários da modificação parietal, como sugerido por Batisse *et al.* (1996) em frutos de cereja. A presença de endossomos, contendo material parietal no interior de vacúolos, sugere que esteja ocorrendo um processo de reabsorção destes materiais, levando à superação da lanosidade quando os frutos de pêssegos ‘Dourado 2’ são transferidos para temperaturas mais elevadas.

O processo de macroendocitose, com a individualização de endossomos contendo substâncias parietais, confirma as observações realizadas ao microscópio fotônico de que as substâncias pécticas estão realmente no interior das células exibindo sintoma de “chilling”.

Agradecimentos – As autoras agradecem à Fapesp pelo financiamento desse projeto, ao CNPq e à Capes pela concessão de bolsa e aos responsáveis e técnicos do Centro de Microscopia do Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu e do NAP-MEPA da Esalq, USP, Campus de Piracicaba, pelas facilidades no preparo das amostras.

Referências bibliográficas

- BHATTACHARYA, P.K., PAPPELIS, A.J., SONG-CHIAN, D.L., BEMILLER, J.M. & KARAGIANNIS, C.S. 1996. Nuclear (DNA, RNA, histone and non-histone protein) and nucleolar changes during growth and senescence of many apple leaves. *Mechanisms of Ageing and Development* 92:83-99.
- BATISSE, C., BURET, M., COULOMB, P.J. & COULOMB, C. 1996. Ultrastructure des parois de cerises Bigarreau Burlat de textures différentes au cours de la maturation. *Canadian Journal of Botany* 74:1974-1981.
- BEN-ARIE, R. & KISLEV, N. 1979. Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. *Plant Physiology* 64:197-202.
- BEN-ARIE, R. & SONEGO, L. 1980. Pectolytic enzyme activity involved in woolly breakdown of stored peaches. *Phytochemistry* 18:2553-2555.
- BROVELLI, E.A., BRECHT, J.K., SHERMAN, W.B. & SIMS, C.A. 1998. Anatomical and physiological responses of melting and nonmelting-flesh peaches to postharvestchilling. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123:668-674.
- GOTTINARI, R.A., ROMBALDI, C.V., SILVEIRA, P. & ARAÚJO, P.J. 1998. Frigoconservação de pêssego (*Prunus persica* (L.) Batsch) cv. BR1. *Revista Brasileira de Agrociência* 4:47-54.
- KING, G.A., HENDERSON, K.G. & LILL, R.E. 1989. Ultrastructural changes in the nectarine cell wall accompanying ripening and storage in a chilling-resistant and chilling-sensitive cultivar. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 17:337-344.
- LUCHSINGER, L.E. & WALSH, C.S. 1998. Chilling injury of peach fruit during storage. *Acta Horticulturae* 464:473-477.
- LUZA, J.G., VANGORSEL, R., POLITO, V.S. & KADER, A.A. 1992. Chilling injury in peaches: A cytochemical and ultrastructural cell wall study. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117:114-118.
- PRESSEY, R. & AVANTS, J.K. 1973. Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiology* 52:252-256.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate and high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17:208-212.
- SAKAI, W.S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technology* 48:247-249.
- SILVA, E.M.J. & MACHADO, S.R. 1999. Ultrastructure and cytochemistry of pearl gland in *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.- Piperaceae. *Nordic Journal of Botany* 19:623-634.
- VON MOLLENDORFF, L.J., JACOBS, G. & DE VILLIERS, O.T. 1992. Cold storage influences internal characteristics of nectarines during ripening. *HortScience* 27:1295-1297.
- WATSON, M.L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysics and Biochemistry Cytology* 4:475.
- ZHOU, H-W., BEN ARIE, R. & LURIE, S. 2000. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. *Phytochemistry* 55:191-195.