

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL**



**Mejora de la vida comercial, calidad y conservación  
del fruto de calabacín (*Cucurbita pepo* L.): estudio  
comparativo en variedades comerciales**

Fátima Carvajal Moreno

TESIS DOCTORAL

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Fátima Carvajal Moreno  
D.L.: GR 1919-2014  
ISBN: 978-84-9083-092-5



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL**

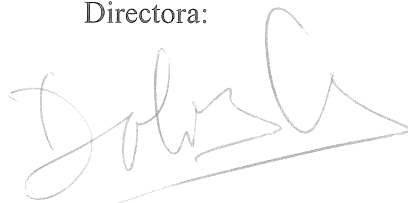
**Mejora de la vida comercial, calidad y conservación  
del fruto de calabacín (*Cucurbita pepo* L.): estudio  
comparativo en variedades comerciales**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Biología  
Dña. Fátima Carvajal Moreno para aspirar al grado de Doctor



Fdo: Fátima Carvajal Moreno

Directora:



Fdo: Dolores Garrido Garrido

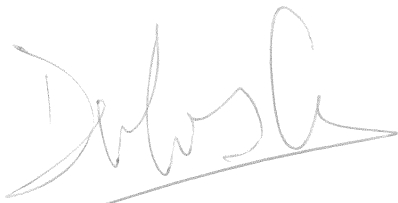
Profesora Titular de la Universidad de Granada



La doctoranda Fátima Carvajal Moreno y la directora de la tesis la Dr. Dolores Garrido Garrido garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de la directora de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

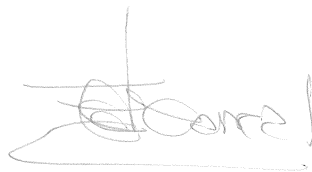
Granada a Abril de 2014

Directora de la Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dolores Garrido Garrido', with a long horizontal stroke extending to the left.

Fdo.: Dolores Garrido Garrido

Doctoranda

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fátima Carvajal Moreno', with a horizontal stroke at the bottom.

Fdo.: Fátima Carvajal Moreno

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de Investigación AGR-209 “Fisiología y Patología de plantas de interés en el área mediterránea” del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Granada. Para la realización del mismo, la Lda. Fátima Carvajal Moreno fue financiada por las siguientes fuentes:

- Beca Predoctoral del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP2009-0454).
- Beca de movilidad FPU para estancias breves del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte disfrutada en el Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Argentina, bajo la supervisión del Dr. Gustavo Polenta. Realizada del 13 de Septiembre al 12 de Diciembre de 2011.
- Proyectos de Investigación del Plan Nacional del Ministerio de Economía y Competitividad: AGL2008-05619-C02-01 y AGL2011-30568-C02-01.

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

- **XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV) XI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal**  
Caracterización bioquímica y molecular de una poligalacturonasa de fruto de calabacín (*Cucurbita pepo* L.).
- **Science and Horticultural for People-IHC 28<sup>th</sup> International Horticultural Congress**  
Varietal responses of zucchini squash fruit to storage temperature.
- **XIX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV) XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal**  
Cambios fisiológicos durante la conservación en frío en frutos en calabacín (*Cucurbita pepo* L.).
- **XIII Congreso CYTAL<sup>®</sup> Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

Potencial saludable de 5 variedades de fruto de calabacín (*Cucurbita pepo* morfotipo *Zucchini*) durante el almacenamiento postcosecha.

- **XI Reunión de Biología Molecular de Plantas**  
Niveles de expresión de genes de ablandamiento del fruto y estrés oxidativo durante la frigoconservación en dos variedades de calabacín (*Cucurbita pepo* L.).
- **X Simposio Nacional VII Ibérico sobre Maduración y Postcosecha**  
Cambios en el metabolismo fenólico durante la conservación en frutos de calabacín (*Cucurbita pepo* L.)
- **XX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV)**  
**XIII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal**  
Preconditioning treatments improve physiological response to chilling stress in zucchini fruits (*Cucurbita pepo* L.).
- **XX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV)**  
**XIII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal**  
Preconditioning treatments improve physiological response to chilling stress in zucchini fruits (*Cucurbita pepo* L.).
- **I Workshop de Jóvenes Biotecnólogos**  
Mejora de la postcosecha de frutos de calabacín (*Cucurbita pepo* L.).

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

**Carvajal F., Martínez C., Jamilena M., Garrido D.** (2011) Differential response of zucchini varieties to low storage temperature. *Scientia Horticulturae* 130: 90-96.

**Carvajal F., van de Velde F., López-Cadenas V., Pirovani M.E., Güemes D.R., Jamilena M., Garrido D.** (2012) Cambios en el metabolismo fenólico durante la conservación en frutos de calabacín (*Cucurbita pepo* L.). En: *Avances en postcosecha de frutas y hortalizas* (Eds. I. Recasens, J. Graell, G.

Echevarría) 143-149. Ediciones de la Universitat de Lleida, Lleida, España. ISBN: 978-84-695-4683-3.

**Palma F., Carvajal F., Jamilena M., Garrido D.** (2014) Involvement of polyamine metabolism in the postharvest cold storage of zucchini fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* (Bajo revisión).

**Carvajal F., Palma F., Jamilena M., Garrido D.** (2014) Preconditioning treatment induces chilling tolerance in zucchini fruit improving different physiological mechanisms against cold storage. *LWT - Food Science and Technology* (Enviado).

**Palma F<sup>1</sup>., Carvajal F<sup>1</sup>., Jamilena M., Garrido D.** (2014) Changes in fatty acid content and membrane integrity in zucchini fruit during postharvest storage. (En preparación).

Otros trabajos publicados:

**Martínez, C., Manzano, S., Megías, Z., Rubio, A., Valenzuela, J.L., Jamilena, M., Carvajal, F., Garrido, D.** (2012) Effects of auxin-induced parthenocarpy on ethylene production and postharvest quality attributes of zucchini fruit. *Acta Horticulturae* 934: 1319 – 1326.

**López-Cadenas V., Carvajal F., Jamilena M., Garrido D.** (2012) Daños por frío en fruto de calabacín (*Cucurbita pepo* L.): comparativa de zonas dañadas y sanas de exocarpo. En: *Avances en postcosecha de frutas y hortalizas* (Eds. I. Recasens, J. Graell, G. Echevarría) 15-21. Ediciones de la Universitat de Lleida, Lleida, España. ISBN: 978-84-695-4683-3.

**Carvajal F., Garrido D., Jamilena M., Rosales R.** (2014) Cloning and characterization of a putative pollen-specific polygalacturonase gene (*CpPGI*) differentially regulated during pollen development in zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Biology* 16 (2): 457-466.

**Palma F., Carvajal F., Jamilena M., Garrido D.** (2014) Changes in carbohydrate content in zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) under low temperature stress. *Plant Science* 217-218: 78-86.



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>A</b>		APX	Ascorbato peroxidasa
Aa	Aminoácido	AREB	<i>ABA-Responsive Element-Binding Protein</i>
AA	Ascorbato	ARN	Ácido ribonucleico
AAO	Aldehído oxidasa	AS	Ácido salicílico
ABA	Ácido abscísico	ATAF	<i>Arabidopsis Transcription Activation Factor</i>
ABADH	4-aminobutiraldehído deshidrogenasa	ATP	Adenosín trifosfato
ABF	<i>ABA-Binding Factor</i>	<b>B</b>	
ABH	Anticuerpo	BA2H	Ácido benzoico 2-hidroxilasa
Ac	Anticuerpo	BHT	Arginina descarboxilasa
AC	Atmósfera controlada	BADH	Betaína aldehído deshidrogenasa
ACC	Ácido aminociclopropano carboxílico	<b>C</b>	
ACCO	ACC oxidasa	CAT	Catalasa
ACCS	ACC sintasa	CBF	<i>C-repeat Binding Factors</i>
ADC	Arginina descarboxilasa	CMO	Colina monoxigenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico	COR	<i>Cold-Responsive genes</i>
ADNc	ADN complementario	CPA	Carbamoilputrescina amidohidrolasa
ADP	Adenosín difosfato	CUC	<i>CUp-shaped Cotyledon</i>
AGPAT	Acilglicerol fosfato aciltransferasa	<b>D</b>	
AIA	Ácido indolacético	DAG	Diacilglicerol
AIH	Agmatina imino hidrolasa	DAO	Diamino oxidasa
AJ	Ácido jasmónico	DF	Daños por frío
AM	Atmósfera modificada	DHAR	Deshidroascorbato reductasa
AMP	Adenosín monofosfato	DNS	Ácido dinitrosalicílico

DO	Densidad óptica	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
DREB	<i>Dehydration-Responsive Element-Binding protein</i>	ICS	isocorismato sintasa
DTT	DL-Ditiotreitol	IP	inositol fosfato
<b>E</b>		IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ECS	γ-glutamyl-L-cisteína sintetasa	<b>L</b>	
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	LB	Luria-Bernati
EF-1α	Factor de elongación 1α	LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant proteins</i>
ET	Etileno	<b>M</b>	
<b>F</b>		1-MCP	1-metilciclopropeno
FAD	Desaturasa	MDA	Malondialdehído
FRAP	<i>Ferric Reducing Ability of Plasma</i>	MDHAR	Monodeshidroascorbato reductasa
<b>G</b>		MDS	Mínimas diferencias significativas
GABA	Ácido γ-aminobutírico	MeJA	Jasmonato de metilo
GABA-T	GABA transaminasa	MeSA	Salicilato de metilo
GAD	Glutamato descarboxilasa	MYB	<i>MYeloCytomatosi oncogene</i>
GB	Glicina-betaína	MYC	MYeloBlastosis oncogene
GPAT	Glicerol fosfato aciltransferasa	<b>N</b>	
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	NAC	NAM-ATAF-CUC
GR	Glutación reductasa	NADP	Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato oxidado
GS	Glutación sintetasa	NADPH	Nicotinamín adenina dinucleótido fosfato reducido
GSH	Glutación reducido	NAM	<i>No Apical Meristem</i>
GSSG	Glutación oxidado	NBT	Azul de nitrotetrazolio
<b>H</b>		NCED	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa
HSP	Proteína de choque térmico	<b>O</b>	



OAT	Ornitina- $\delta$ -aminotransferasa	PtdCho	Fosfatidilcolina
ODC	Ornitina descarboxilasa	PtdEtn	Fosfatidiletanolamina
<b>P</b>		PtdGro	Fosfatidilglicerol
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida	Put	Putrescina
PAL	Fenilalanina amonio-liasa	PVPP	Polivinil polipirrolidona
PAO	Poli-amino oxidasa	<b>R</b>	
pb	Pares de bases	ROS	Especies de oxígeno reactivo
PBS	Tampón fosfato salino	rpm	revoluciones por minuto
P5C	Pirrolina 5-carboxilato	RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P5CR	Pirrolina 5-carboxilato reductasa	<b>S</b>	
P5CS	Pirrolina 5-carboxilato sintetasa	SAM	S-adenosil-L-metionina
PDH	Prolina deshidrogenasa	SAMDC	SAM descarboxilasa
PF	Peso fresco	SAMS	SAM sintetasa
PG	Poligacturonasa	SDS	Dodecil sulfato sódico
PI	Fosfoinosítidos	smHSP	Proteína de choque térmico de bajo peso molecular
PLA <sub>1</sub>	Fosfolipasa A <sub>1</sub>	SOD	Superóxido dismutasa
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>	Spd	Espermidina
PLB	Fosfolipasa C	SpdS	Espermidina sintasa
PLC	Fosfolipasa C	Spm	Espermina
PLD	Fosfolipasa D	SpmS	Espermina sintasa
PME	Pectin metilesterasa	SSADH	Succinato semialdehído deshidrogenasa
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo	<b>T</b>	
PPO	Polifenol oxidasa	TAE	Tampón tris-acético-EDTA
POD	Peroxidasa	TBS	Tampón Tris salino
PR	Proteína relacionada con patogénesis	TBA	Ácido tiobarbitúrico

TBARS	Sustancias reactivas del TBA
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilén-diamina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triacina
<b>U</b>	
UFP	Proteína de fusión a ubiquitina
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
<b>X</b>	
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>Z</b>	
ZEP	Zeaxantina epoxidasa
ZF-HD	<i>Zinc-Finger Homeodomain</i>



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. EL CALABACÍN.....	3
1.1.1. Origen.....	3
1.1.2. Importancia del cultivo de calabacín en España.....	4
1.2. LOS DAÑOS POR FRÍO.....	6
1.2.1. Cambios en las membranas.....	8
1.2.2. Modificaciones de la pared celular.....	13
1.2.3. Inducción de estrés oxidativo.....	14
a) Antioxidantes enzimáticos.....	14
b) Antioxidantes no enzimáticos.....	18
1.2.4. Implicación de fitohormonas y reguladores del crecimiento.....	19
a) Etileno.....	19
b) Ácido abscísico.....	20
c) Ácido jasmónico.....	21
d) Ácido salicílico.....	21
e) Poliaminas.....	22
f) Ácido $\gamma$ -aminobutírico.....	23
1.2.5. Metabolitos relacionados con el estrés.....	24
a) Prolina.....	24
b) Glicina-betaína.....	25
1.2.6. Regulación de la expresión génica.....	26
1.3. TRATAMIENTOS POSTCOSECHA QUE REDUCEN LOS DAÑOS POR FRÍO.....	27
1.3.1. Tratamientos físicos.....	27
a) Atmósferas controladas y modificadas.....	27
b) Tratamientos con CO <sub>2</sub> .....	28
c) Tratamientos térmicos.....	28
d) Preacondicionamiento a temperaturas moderadas.....	29
1.3.2. Tratamientos químicos.....	30
a) Etileno y 1-MCP.....	30
b) Poliaminas.....	30
c) Ácidos jasmónico y salicílico.....	30

<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. MATERIAL VEGETAL Y TRATAMIENTOS APLICADOS.....	39
3.1.1. Material vegetal.....	39
3.1.2. Tratamientos aplicados.....	39
3.2. ANÁLISIS FISIOLÓGICOS.....	40
3.2.1. Pérdida de peso.....	40
3.2.2. Índice de daños por frío.....	40
3.2.3. Parámetros texturales .....	40
3.2.4. Pérdida de electrolitos .....	41
3.2.5. Microscopía óptica.....	41
3.2.6. Microscopía electrónica de barrido .....	42
3.2.7. Microscopía electrónica de transmisión.....	43
3.3. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS .....	44
3.3.1. Enzimas modificadoras de la pared celular .....	44
a) Poligalacturonasa .....	44
b) Pectin metilesterasa.....	44
3.3.2. Enzimas del catabolismo de lípidos .....	45
a) Fosfolipasas C y D .....	45
b) Lipoxigenasa .....	45
3.3.3. Enzimas del metabolismo oxidativo.....	46
a) Extracción .....	46
b) Superóxido dismutasa .....	46
c) Catalasa .....	47
d) Peroxidasa total.....	47
e) Ascorbato peroxidasa .....	47
f) Glutatión reductasa .....	48
g) Monodeshidroascorbato y deshidroascorbato reductasa.....	48
3.3.4. Enzimas del metabolismo fenólico.....	49
a) Fenilalanina amonio-liasa .....	49
b) Polifenol oxidasa.....	49
3.3.5. Enzimas del catabolismo de poliaminas: diamino y poliamino oxidasa.....	50
3.3.6. Extracción de proteínas para inmunotransferencia.....	50
3.3.7. Concentración de proteínas .....	50

3.3.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	50
a) Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	50
b) Geles de poliacrilamida en condiciones nativas.....	51
3.3.9. Transferencia e inmunodetección de proteínas .....	51
3.3.10. Análisis de imágenes .....	52
3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....	52
3.4.1. Peroxidación lipídica.....	52
3.4.2. Peróxido de hidrógeno .....	53
3.4.3. Capacidad antioxidante y fenoles totales .....	53
a) Extracción .....	53
b) Capacidad antioxidante: DPPH y FRAP.....	53
c) Fenoles totales.....	54
3.4.4. Pigmentos, prolina, aminoácidos libres y azúcares solubles totales.....	54
a) Extracción .....	54
b) Pigmentos.....	54
c) Prolina .....	55
d) Aminoácidos libres .....	55
e) Azúcares solubles totales .....	55
3.4.5. ATP, ADP y AMP.....	55
3.4.6. Ascorbato total .....	56
3.4.7. Glutación total.....	57
3.4.8. Ácidos grasos .....	58
3.4.9. Poliaminas .....	58
3.4.10. ACC.....	59
3.4.11. Ácido $\gamma$ -aminobutírico, ácido glutámico y betaína.....	60
3.4.12. Ácidos salicílico, jasmónico, abscísico e indolacético.....	60
3.5. ANÁLISIS MOLECULARES .....	62
3.5.1. Extracción de ARN total .....	62
3.5.2. Tratamiento con ADNasa.....	62
3.5.3. Síntesis de ADNc .....	62
3.5.4. RT-PCR.....	62
3.5.5. Preparación de bacterias competentes.....	64
3.5.6. Transformación .....	65
3.5.7. Extracción de ADN plasmídico.....	65
3.5.8. Secuenciación.....	65
3.5.9. RT-PCR semicuantitativa.....	66
3.5.10. RT-PCR cuantitativa .....	66

3.5.11. Herramientas bioinformáticas .....	66
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	67
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
4.1. 4.1. CAPÍTULO 1: Análisis varietal del comportamiento postcosecha de los frutos de calabacín .....	71
4.1.1. Cambios físicos producidos durante la postcosecha de calabacín de distintas variedades .....	71
a) Aspecto externo.....	71
b) Pérdida de peso .....	74
c) Daños por frío .....	74
d) Análisis histológico.....	74
e) Análisis textural .....	77
4.1.2. Cambios bioquímicos producidos durante la postcosecha de calabacín de distintas variedades.....	81
a) Peroxidación lipídica.....	81
b) Peróxido de hidrógeno .....	82
c) Actividad peroxidasa total.....	83
d) Actividad catalasa .....	83
e) Capacidad antioxidante total .....	85
f) Fenoles totales .....	87
4.1.3. Enzimas modificadoras de la pared celular durante la conservación de los frutos de calabacín .....	88
4.1.4. Correlación entre las determinaciones realizadas y los DF.....	91
4.1.5. Apéndice.....	93
4.2. CAPÍTULO 2: Estudio de la respuesta al frío en frutos de variedades con distinto grado de tolerancia.....	99
4.2.1. Postcosecha de los frutos Natura y Sinatra .....	99
a) Aspecto externo.....	99
b) Pérdida de peso y DF .....	100
4.2.2. Daños en las membranas de los frutos Natura y Sinatra .....	101
a) Pérdida de electrolitos y peroxidación lipídica .....	101
b) Fosfolipasa C, fosfolipasa D y lipoxigenasa.....	102
c) Perfil y contenido de ácidos grasos totales.....	104
d) Estatus energético .....	106
4.2.3. Metabolismo oxidativo en los frutos Natura y Sinatra.....	108

a) Peróxido de hidrógeno .....	108
b) Niveles de ascorbato y glutatión .....	108
c) Superóxido dismutasa y catalasa.....	109
d) Enzimas del ciclo ascorbato-glutatión .....	110
e) Fenilalanina amonio-liasa y polifenol oxidasa.....	111
f) Análisis de expresión.....	112
4.2.4. Reguladores del crecimiento y metabolitos relacionados con el estrés en los frutos Natura y Sinatra.....	114
a) Poliaminas .....	114
b) Ácidos $\gamma$ -aminobutírico y glutámico.....	116
c) ACC y expresión de <i>CpACO1</i> .....	116
d) Otras fitohormonas.....	117
e) Prolina y aminoácidos libres totales.....	118
f) Azúcares solubles totales.....	120
4.3. CAPÍTULO 3: Selección de tratamientos postcosecha para la mejora de la frigoconservación de los frutos de calabacín .....	121
4.3.1. Efecto de distintos tratamientos químicos sobre la postcosecha de los frutos de calabacín.....	121
a) Etileno .....	121
b) 1-MCP.....	122
c) Jasmonato de metilo .....	123
d) Poliaminas.....	124
4.3.2. Efecto de distintos tratamientos físicos sobre la postcosecha de los frutos de calabacín: tratamiento térmico y preacondicionamiento.....	125
a) Aspecto externo.....	126
b) Pérdida de peso .....	127
c) Índice de daños por frío.....	128
d) Pérdida de electrolitos.....	128
e) Peroxidación lipídica.....	129
f) Niveles de peróxido de hidrógeno .....	130
g) Fenoles totales.....	131
h) Patrón de proteínas.....	131
i) Acumulación de proteínas de estrés.....	132
4.4. CAPÍTULO 4: Cambios fisiológicos, bioquímicos moleculares inducidos por el preacondicionamiento en los frutos de calabacín.....	135



4.4.1. Efecto del preacondicionamiento sobre la postcosecha de los frutos de calabacín .....	135
a) Aspecto externo.....	135
b) Pérdida de peso y DF .....	136
c) Análisis de pigmentos .....	137
4.4.2. Efecto del preacondicionamiento sobre los cambios producidos en las membranas por el frío .....	138
a) Pérdida de electrolitos y peroxidación lipídica .....	138
b) Estatus energético .....	139
c) Actividad lipoxigenasa.....	141
d) Expresión de <i>CpPLD1</i> .....	141
e) Contenido en ácidos grasos .....	142
f) Análisis microscópicos .....	142
g) Expresión de <i>CpFAD2</i> .....	146
4.4.3. Efecto del preacondicionamiento sobre el metabolismo oxidativo	146
a) Contenido en peróxido de hidrógeno .....	146
b) Actividad superóxido dismutasa .....	147
c) Actividad catalasa .....	148
d) Actividad peroxidasa .....	149
e) Ciclo de ascorbato-glutatión.....	150
f) Expresiones.....	154
4.4.3. Efecto del preacondicionamiento sobre reguladores del crecimiento y metabolitos relacionados con el estrés .....	156
a) Poliaminas .....	156
b) Expresión de <i>CpADC1</i> y <i>CpODC1</i> .....	158
c) Actividades DAO y PAO .....	159
d) Contenido en ACC y expresión de <i>CpACO1</i> .....	160
e) Prolina y betaína.....	161
f) Aminoácidos libres y azúcares solubles totales.....	162
g) Ácidos $\gamma$ -aminobutírico y glutámico.....	163
h) Otras fitohormonas.....	164
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>165</b>
5.1. Comportamiento postcosecha de los frutos de calabacín .....	167
5.2. Análisis histológico de los daños por frío .....	169
5.3. Cambios en las membranas .....	170
5.4. Modificaciones de la pared celular .....	173
5.5. Inducción de estrés oxidativo y defensa antioxidante .....	174

5.6. Implicación en la respuesta de los frutos de fitohormonas y reguladores del crecimiento.....	179
5.7. Metabolitos relacionados con la respuesta al estrés durante la postcosecha de los frutos de calabacín .....	183
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>185</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>189</b>

## RESUMEN

El calabacín (*Cucurbita pepo* L. morfotipo Zucchini) es un cultivo de gran importancia económica en España, centrándose gran parte de su producción en la provincia de Almería. La mayor parte del calabacín que se produce en nuestro país tiene como destino la exportación. Para prolongar la vida comercial del fruto cosechado, tanto durante el transporte como en la comercialización, se utilizan bajas temperaturas durante la conservación. Debido a su origen subtropical, el calabacín es susceptible a desarrollar lo que se conoce como daños por frío (DF). Los DF son desórdenes fisiológicos que afectan a muchas plantas, principalmente de origen tropical y subtropical, cuando son expuestas a bajas temperaturas, aunque por encima del punto de congelación. La sintomatología es muy variada y depende de la especie. En los frutos de calabacín, consiste en pérdida de agua, hundimientos y picado de la superficie, que causan graves pérdidas económicas. La principal causa del desarrollo de DF son las alteraciones que se producen en las membranas de las especies sensibles debido a las bajas temperaturas. El estrés oxidativo generado por el frío es otra de las causas que originan la aparición de DF.

Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de la frigoconservación del fruto de calabacín. Se ha realizado un análisis de la conservación en frío de frutos de distintas variedades comerciales cultivadas en la provincia de Almería. El objeto del mismo fue la selección de genotipos con mayor tolerancia al frío y más sensibles al mismo, y la selección de metabolitos y enzimas que pudieran correlacionarse con el estrés y con la resistencia al mismo. Como resultado se seleccionaron dos variedades más y menos tolerantes, y en ellas se estudiaron distintos parámetros indicativos de daños en membranas y de inducción de estrés oxidativo. Se analizó el proceso de frigoconservación en las variedades seleccionadas mediante el estudio de los cambios a nivel de membrana, la inducción de estrés oxidativo y de la defensa antioxidante, así como la implicación de fitohormonas, reguladores del crecimiento y metabolitos de estrés. Los frutos de la variedad más tolerante mostraron un menor grado de estrés y una mayor defensa antioxidante. Con objeto encontrar tratamientos que permitan mejorar la calidad de los frutos durante su almacenamiento en frío,

incluso en variedades tolerantes, se aplicaron distintos tratamientos químicos y físicos previos a la conservación refrigerada. De los tratamientos aplicados, el preacondicionamiento a una temperatura moderada fue el más efectivo en la reducción del desarrollo de DF. El análisis en profundidad de los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares que se producen en los frutos con la aplicación de este tratamiento mostró que la tolerancia al frío inducida por este tratamiento se relaciona con mantenimiento de la integridad de las membranas, un importante incremento de la defensa antioxidante y la acumulación de metabolitos relacionados con la resistencia frente a condiciones de estrés.

# 1.INTRODUCCIÓN

---







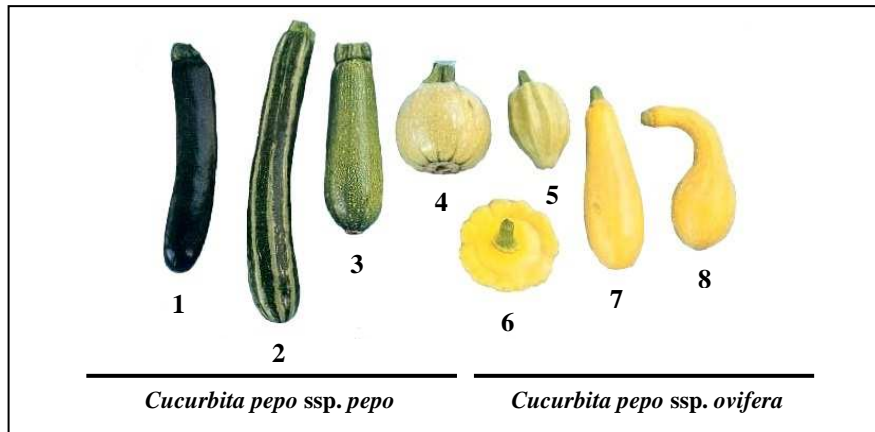
## 1.1. El calabacín

### 1.1.1. Origen

El calabacín (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo*) pertenece a la familia *Cucurbitaceae*, que comprende aproximadamente 130 géneros y unas 800 especies (Jeffrey, 1990). Esta familia se divide en dos subfamilias: *Zanonioidae*, que incluye 19 géneros y unas 60 especies, y *Cucurbitoidae*, que agrupa 111 géneros y 740 especies (Jeffrey, 2005; Esteras y cols., 2011), algunas de las cuales tienen gran importancia económica por sus frutos como es el caso de la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mat. & Nak.), el melón (*Cucumis melo* L.), el pepino (*Cucumis sativus* L.), la calabaza y el calabacín (*Cucurbita maxima* Duch., *Cucurbita moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. & Poir y *Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo*).

El género *Cucurbita*, originario de América, es uno de los más diversos de la familia. Está formado por 22 especies salvajes y 5 cultivadas, *C. pepo* L., *C. maxima* Duch. *C. moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. & Poir, *C. argyrosperma* Huber. y *C. ficifolia* Bouchè. Las cinco especies son plantas mesófitas, las cuatro primeras anuales y la última perenne (Bisognin, 2002).

Han existido dos eventos de domesticación independientes de *C. pepo*, uno en el sur de Méjico y otro en el este de Estados Unidos (Smith, 2006; Paris y cols., 2012). Cada uno dio origen a las dos subespecies que comprende la especie, ssp. *pepo* y ssp. *ovifera*, cada una con distintas variedades botánicas o morfotipos clasificados atendiendo a la morfología de sus frutos y confirmados mediante análisis moleculares. Dentro de *C. pepo* ssp. *pepo* se encuentran Pumpkin, Vegetable Marrow, Cocozelle y Zucchini, mientras que Acorn, Scallop, Crookneck y Straightneck pertenecen a *C. pepo* ssp. *ovifera* (Ferriol y cols., 2003; Paris y cols., 2003). En la Figura 1.1.1 se muestran los distintos frutos de estos morfotipos de entre 2 y 5 días después de la antesis. La importancia de esta especie se basa en lo ampliamente extendido que se encuentra el consumo de los frutos inmaduros de Vegetable Marrow, Cocozelle Scallop, Crookneck y Straightneck y de los frutos maduros de Pumpkin y Acorn (Blanca y cols., 2011).



**Figura 1.1.1.** Frutos inmaduros (2-5 días postantesis) de los 8 morfotipos de *Cucurbita pepo* L. Los 4 primeros corresponden a la subespecie *pepo* y los 4 últimos a la subespecie *ovifera*. 1: Zucchini, 2: Cocozelle, 3: Vegetable Marrow, 4: Pumpkin, 5: Acorn, 6: Scallop, 7: Straightneck, y 8: Crookneck. Adaptado de Paris y cols. (2003).

El calabacín corresponde con el morfotipo zucchini. El término es de origen italiano y proviene del diminutivo en plural de la palabra *zucca* que significa calabaza de verano. Es la variedad más reciente de *C.pepo*, siendo descrita por primera vez por Tamaro en 1901. Desde Italia en los años veinte, se introdujo en los EE.UU. donde pasada una década formó un grupo bien definido (Paris, 1996). Las variedades de calabacín cultivadas en la actualidad son híbridos mejorados en América en los últimos 50 años, obtenidos a partir de variedades italianas.

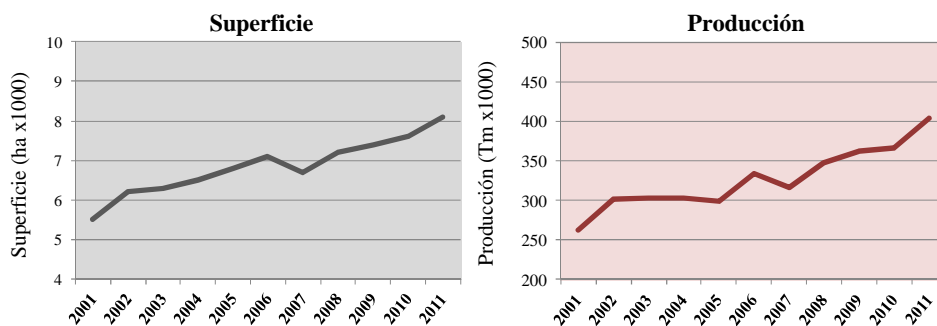
### 1.1.2. Importancia del cultivo de calabacín en España

El cultivo de calabacín tiene gran importancia económica en España. Si se analiza la serie histórica de superficie y producción de calabacín puede verse el incremento experimentado en los últimos años, tanto la superficie dedicada a su cultivo como su producción (Figura 1.1.2). En el año 2012, el 75% de la producción española de calabacín se concentró en la provincia de Almería. Esta provincia es la principal productora de España por su suelo, clima y tradición de cultivo, siendo también la principal exportadora. En ella, el calabacín es uno de los cultivos hortícolas más importantes ocupando en los años 2011 y 2012 el quinto y cuarto puesto a nivel de producción (Figura 1.1.3). Con relación a la

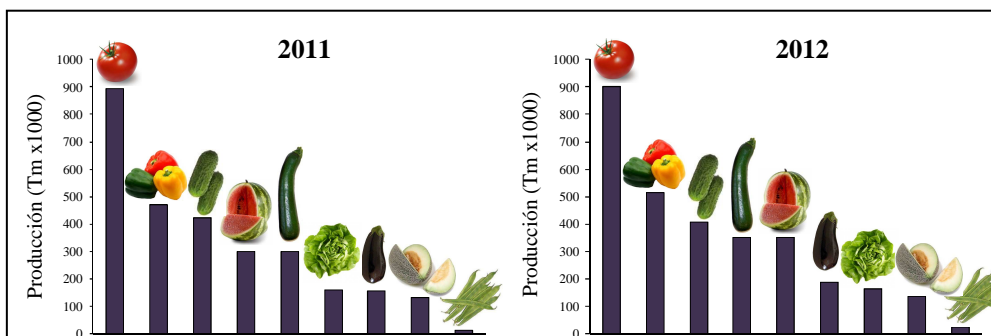




campeña anterior, los avances de producción de 2013 indican un aumento de un 5.4% en la producción de calabacín.



**Figura 1.1.2.** Serie histórica de superficie y producción de fruto de calabacín en España. Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de estadística 2012.

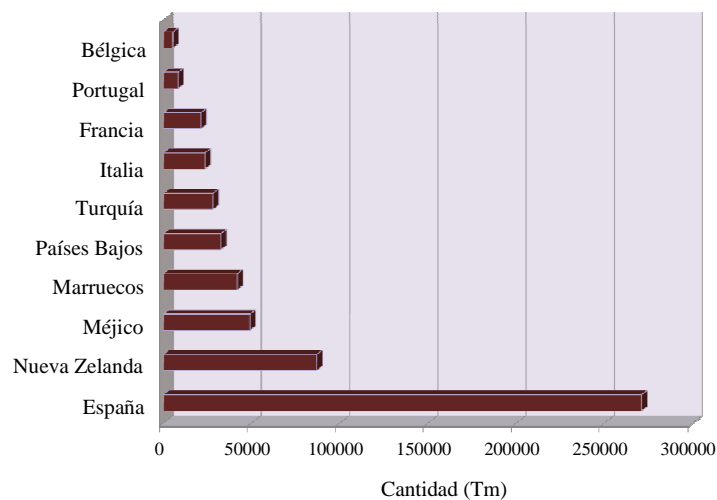


**Figura 1.1.3.** Principales cultivos de la provincia de Almería según su producción en los años 2011 (definitiva) y 2012 (provisional). Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Avances de superficies y producciones de cultivos 2013.

Gran parte de la producción española de calabacín tiene como objetivo la exportación. Según las estadísticas de la FAO, España es el primer país exportador de calabacines y calabazas a nivel mundial (Figura 1.1.4). Teniendo en cuenta que la producción de calabacín en España es un 90% superior a la de calabaza, la mayor parte de estas exportaciones corresponden a frutos de



calabacín. Los mayores importadores del calabacín que se produce en España son Francia, Reino Unido y Alemania. El transporte de los frutos hacia esos países se realiza en camiones o remolques frigoríficos a una temperatura entre 4 y 7°C. En este contexto, el manejo postcosecha es fundamental para mantener la calidad y prolongar la vida comercial. Para que evitar las pérdidas económicas durante el proceso de transporte y comercialización.



**Figura 1.1.4.** Principales países exportadores de calabazas y calabacines, incluyendo confituras, en 2011. Fuente: FAO. FAOSTAT.

## 1.2. Los daños por frío

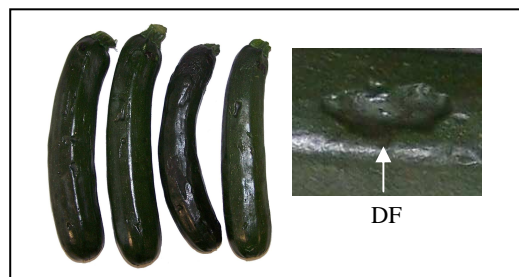
Los frutos, dependiendo de su origen, se pueden clasificar en tres grandes grupos (Kader, 2002):

- Frutos atemperados. Proceden de regiones templadas como los pomos, frutos con hueso y bayas.
- Frutos subtropicales. Pueden dividirse en cítricos y no cítricos como aguacate, chirimoya, higo, kiwi, aceituna, granada, calabacín, pepino, etc.
- Frutos tropicales. Los frutos tropicales más importantes son plátanos, mangos, papayas y piñas. Otros cuyo consumo está menos extendido son carambola, fruta de la pasión, lichi, rambután, etc.



Los frutos subtropicales y tropicales son sensibles al frío, pudiendo desarrollar lo que se conoce como daños por frío (DF) cuando se los conserva a bajas temperaturas, lo que suele ocurrir durante su transporte y almacenaje. Los DF son desórdenes fisiológicos que afectan a muchas plantas, principalmente de origen tropical y subtropical, cuando son expuestas a bajas temperaturas aunque por encima del punto de congelación (Lyons, 1973). La severidad de los DF va a depender de la especie y la variedad, así como de , la temperatura y el tiempo de exposición a la misma, el estado de maduración, e incluso de factores previos a la cosecha (Ferguson y cols., 1999). En numerosas especies, los frutos que se cosechan inmaduros, como sucede con el calabacín, son más propensos a desarrollar daños (Lim y cols., 2009; Qian y cols., 2013). Los DF que se producen en los frutos en muchos casos, se manifiestan cuando se transfieren a una temperatura superior, que sería lo que ocurre cuando los frutos pasan de las cámaras de almacenamiento al expositor a temperatura ambiente. Sin embargo, en otros, los síntomas son ya visibles durante la conservación en frío.

Los síntomas de los DF pueden dividirse en dos categorías (Sevillano y cols., 2009). La primera consiste en alteraciones en el metabolismo y desarrollo, que se traducen en una maduración anómala. La segunda incluye los síntomas fisiológicos que, dependiendo de la especie, pueden manifestarse de distinta forma como por ejemplo hundimientos y picado de la superficie del fruto, pardeamiento externo e interno, vitescencia, infiltraciones acuosas, desarrollo de texturas anómalas como puede ser algodonosa, harinosa, gelatinosa o gomosa, y una menor resistencia al daño mecánico y al ataque de patógenos. En el caso del calabacín, los síntomas de DF en los frutos consisten en hundimientos y picado de la superficie del fruto (Figura 1.2.1), acompañados de pérdida de peso y ablandamiento (Mencarelli y cols., 1983; Serrano y cols., 1998; Martínez-Téllez y cols., 2002).



**Figura 1.2.1.** Daños por frío (DF) desarrollados en la superficie de frutos de calabacín conservados 14 días a 4°C.



Para que los DF se desarrollen, tienen que producirse numerosas alteraciones fisiológicas y bioquímicas que afectan a todo el metabolismo celular, e incluyen alteraciones en las membranas, modificaciones de la pared celular, inducción de estrés oxidativo, cambios en los niveles de fitohormonas, reguladores del crecimiento y metabolitos relacionados con la respuesta al estrés.

### **1.2.1. Cambios en las membranas**

Las membranas celulares de las especies mejor adaptadas a las bajas temperaturas suelen tener una mayor concentración de ácidos grasos insaturados, que permite una mayor fluidez de dichas membranas (Nishida y Murata, 1996; Murata y Los, 1997). Cuando las especies sensibles al frío se exponen a bajas temperaturas, los lípidos de las membranas sufren numerosas alteraciones. Inicialmente, estas condiciones inducen cambios en las cadenas hidrofóbicas de los ácidos grasos haciendo que las membranas pasen de un estado fluido líquido-cristalino a una forma más ordenada y cristalina de sólido-gel. La exposición prolongada al frío hace que este cambio de fase origine una disminución de la permeabilidad selectiva de las membranas dando lugar a una pérdida de iones, a una disminución de la energía metabólica, y a la desorganización del aparato fotosintético, lo que conlleva la lisis celular (Lyons, 1973). La composición de las membranas es un factor fundamental que va a determinar la temperatura a la que tiene lugar la transición de fase de líquido a sólido. Un mayor contenido en ácidos grasos insaturados hace que las membranas sean menos susceptibles al frío y, por tanto, que la temperatura a la que se produce el cambio de fase sea menor.

En algunas especies, cuando a las plantas o algún órgano de las mismas se les somete a una temperatura moderada antes de ser expuestas al frío, tiene lugar un proceso de aclimatación. Durante este proceso, se inducen cambios físicos y bioquímicos que reestructuran las membranas celulares para adaptarse a las nuevas condiciones. Uno de los cambios es un incremento en la producción de ácidos grasos insaturados, que aumenta la fluidez de las membranas. Este incremento en la producción de ácidos grasos insaturados se produce por aumento en la actividad de las enzimas desaturasas y glicerol-3-fosfato aciltransferasas, que juegan un papel fundamental en la regulación del nivel de insaturación de los ácidos grasos de los lípidos de membrana (Sevillano y cols., 2009).



Las **desaturasas** (FADs, EC 1.3.1.35) introducen dobles enlaces en los ácidos grasos, lo que incrementa su insaturación. En distintos estudios se ha comprobado que el aumento de esta actividad, mediante la transformación de plantas de tabaco con distintas FADs, modifica el perfil de ácidos grasos de sus células, aumentando la insaturación de los mismos; estas plantas tienen también una mayor tolerancia a las bajas temperaturas (Kodama y cols., 1994; Orlova y cols., 2003; Craig y cols., 2008). En *Arabidopsis*, también se ha descrito la importancia de estas enzimas para la tolerancia tanto al frío como a la congelación (Chen y Thelen, 2013). Algunos tratamientos postcosecha que mejoran la tolerancia al frío, se ha visto que incrementan la expresión de *FADs* de forma específica, como en el caso de frutos de pomelo (Sapitnitskaya y cols., 2006).

La enzima **glicerol-3-fosfato aciltransferasas** (GPAT, EC 2.3.1.15) cataliza la transferencia de un ácido graso de un grupo acilo a la posición *sn*-1 del glicerol-3-fosfato. La **1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa** (AGPAT, EC 2.3.1.51) transfiere un segundo ácido graso a la posición *sn*-2 produciendo ácido fosfatídico (Murata y Tasaka, 1997). A partir de él, se forman los fosfoglicéridos como el fosfatidilglicerol. El grado de insaturación va a estar determinado por la selectividad de sustrato de la GPAT. Las GPATs de plantas tolerantes a las bajas temperaturas prefieren ácidos grasos insaturados (18:1) a saturados (16:0) (Frentzen y cols., 1983). Como resultado, en estas especies, la cantidad relativa de ácidos grasos saturados en posición *sn*-1 oscila entre 0 y 20%, mientras que en especies de origen tropical y subtropical sensibles al frío, se encuentra comprendida entre un 15 y un 65% (Murata y cols., 1982). En tomate, la sobreexpresión de una GPAT con selectividad hacia ácidos grasos insaturados incrementa los niveles éstos en las membranas de los tilacoides, reduciendo los daños debidos al frío (Sui y cols., 2007).

Las bajas temperaturas en algunas especies inducen un incremento en la expresión de enzimas del catabolismo de lípidos, principalmente fosfolipasas y lipoxigenasas (Ruelland y cols., 2002; Vergnolle y cols., 2005). La hidrólisis de fosfolípidos y la peroxidación de ácidos grasos puede contribuir a la transición de fase o cambio de estado en las membranas celulares (Paliyath y Droillard, 1992).



## Fosfolipasas

Las fosfolipasas constituyen un grupo diverso de enzimas que se clasifican atendiendo a la posición a la que hidrolizan los fosfolípidos. Se denominan fosfolipasas D (PLD), C (PLC), A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) y B (PLB), dividiéndose a su vez cada una de ellas en subfamilias en base a su secuencia y propiedades bioquímicas (Wang, 2001). La actividad de estas enzimas afecta a la estructura y estabilidad de las membranas, además de intervenir en diversas funciones celulares como la generación de segundos mensajeros, la reorganización del citoesqueleto, el tráfico vesicular, la secreción, el flujo de iones, la remodelación de la membrana y la degradación de lípidos (Wang, 2002). Las fosfolipasas están implicadas en distintos procesos del crecimiento y desarrollo de la planta como son la embriogénesis y la germinación de semillas, la división celular, la senescencia de órganos y en numerosas respuestas frente a estreses bióticos y abióticos (Chapman, 1998).

La **fosfolipasa C** (PLC, EC 3.1.4.3) hidroliza el enlace fosfodiéster de los fosfolípidos produciendo diacilglicerol y grupos fosforilados. Estas enzimas pueden dividirse en tres grupos atendiendo a su especificidad de sustrato y a su función celular. El primer grupo es el más estudiado y está formado por las PLCs específicas de fosfoinosítidos (PI-PLCs) que catalizan la hidrólisis de estos fosfolípidos produciendo 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El segundo lo integran PLCs no específicas o dependientes de fosfatidilcolina (PtdCho-PLCs), que actúan sobre la PtdCho y otros fosfolípidos. El tercer grupo lo constituyen las glicosilfosfatidilinositol PLCs (GPI-PLCs) que liberan el GPI unido a proteínas (Wang, 2001). Todos los organismos usan los lípidos de membrana como precursores de compuestos que intervienen en procesos de señalización. La hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato por acción de la PI-PLC produce DAG e IP<sub>3</sub>, ambas moléculas funcionan como segundos mensajeros frente a distintas señales ambientales (Meijer y Munnik, 2003).

Se ha descrito un aumento de la expresión de genes que codifican PI-PLC bajo distintas condiciones de estrés, entre ellos, el frío (Hirayama y cols., 1995; Ruelland y cols., 2002; Vergnolle y cols., 2005). En la postcosecha de frutas y verduras, la actividad PLC se ha relacionado con distintas alteraciones. En sandía, el almacenamiento de los frutos a 20°C da lugar a la aparición de infiltraciones acuosas relacionadas un aumento de esta actividad mediado por etileno (Mao y cols., 2004). También se ha descrito que algunos tratamientos



que reducen los daños por frío de los frutos de níspero también disminuyen la actividad PLC (Cao y cols., 2009b).

La enzima **fosfolipasa D** (PLD, EC 3.1.4.4) cataliza la hidrólisis de fosfolípidos estructurales, como fosfatidilcolina (PtdCho), fosfatidiletanolamina (PtdEtn) y fosfatidilglicerol (PtdGro), para producir ácido fosfatídico (PA), además de colina, etanolamina y glicerol (Pappan y cols., 1998). En base a su estructura génica, secuencia, dominios y propiedades bioquímicas, se han caracterizado cinco clases de PLD: PLD $\alpha$ , PLD $\beta$ , PLD $\gamma$ , PLD $\delta$  y PLD $\zeta$  (Qin y Wang, 2002).

Diferentes clases de PLD han sido asociadas con la respuesta de las plantas a estreses abióticos. En arroz, estudios transcriptómicos han mostrado que PLD de las clases  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\zeta$  aumentan su expresión en respuesta a distintas condiciones de estrés, entre ellas el frío (Singh y cols., 2012). También se ha visto que la supresión de un gen que codifica una PLD $\alpha$  en *Arabidopsis* hace que las plantas adquieran tolerancia a la congelación (Rajashekar y cols., 2006).

En frutos de pepino, un tratamiento térmico que disminuye los daños desarrollados en los frutos por el almacenamiento en frío disminuye la actividad PLD, junto con la lipoxigenasa (Mao y cols., 2007b; Mao y cols., 2007c). De la misma forma, la aplicación de distintos tratamientos que mejoran la postcosecha en frío de los nísperos disminuyen las actividades PLD, PLC y lipoxigenasa (Cao y cols., 2009b; Rui y cols., 2010).

### **Lipoxigenasa**

La lipoxigenasa (LOX, EC 1.13.11.12) cataliza la dioxigenación de los ácidos grasos insaturados que contienen el sistema cis,cis-1,4-pentadieno para formar hidroperóxidos. Estas enzimas pueden clasificarse en 9-LOX y 13-LOX, dependiendo del átomo de carbono donde realizan la oxigenación, formando cada una (9S)- y (13S)-hidroperóxidos del ácido graso insaturado (Feussner y Wasternack, 2002). Los hidroperóxidos formados por la acción de estas enzimas son perjudiciales para la función de las membranas causando rigidez en las mismas. Además, los hidroperóxidos pueden ser metabolizados en compuestos de gran importancia para la defensa de las plantas como son las oxilipinas y el ácido jasmónico (Baysal y Demirdöven, 2007). Los hidroperóxidos son muy reactivos y pueden formar radicales libres causando daños a las membranas. En muchos frutos, esta enzima contribuye a la



formación de los compuestos volátiles responsables del aroma y del sabor como *n*-hexanal, (*E*)-2-hexenal, *n*-hexenol y (*E*)-2-hexenol (Zhang y cols., 2011; Vogt y cols., 2013; Shen y cols., 2014).

La exposición a bajas temperaturas induce un incremento de la expresión de distintas LOX en plantas de *Arabidopsis* (Seki y cols., 2002; Nemchenko y cols., 2006). Un aumento de esta actividad enzimática, se ha descrito en muchos casos durante la postcosecha en frío de frutos y vegetales. Se ha visto un aumento de actividad LOX a temperaturas que inducen DF en frutos de pepino, incremento que se reduce con tratamientos que disminuyen el desarrollo de daños (Mao y cols., 2007a; Mao y cols., 2007b). De manera contradictoria, el tratamiento con propileno en plátanos retrasa la aparición de daños por frío y aumentan la actividad LOX y el contenido en ácido jasmónico (He y cols., 2014).

### **Estatus energético celular**

El adenosin trifosfato (ATP) es una molécula que almacena la energía generada en las mitocondrias durante la respiración oxidativa, y se utiliza para activar reacciones del metabolismo celular. La tasa respiratoria disminuye debido a las bajas temperaturas produciéndose la inhibición de la fosforilación oxidativa y, como consecuencia, la pérdida de energía metabólica (Lyons y Raison, 1970).

Durante la postcosecha, la disminución de los niveles de ATP se ha relacionado con la aparición de distintos desórdenes fisiológicos, como los daños por frío y pardeamientos, así como con un aumento de la incidencia de infecciones fúngicas. La disminución del estatus energético celular debida a las condiciones de estrés o al proceso de senescencia del fruto hace que no se pueda mantener la integridad de las membranas (Veltman y cols., 2003). En níspero, Cao y cols. (2014) han descrito que el tratamiento con jasmonato de metilo (MeJA) mejora el estatus energético de los frutos haciendo que disminuya el diámetro de las podredumbres ocasionadas por *Colletotrichum acutatum*. Los tratamientos postcosecha basados en la aplicación exógena de ATP elevan los niveles internos del mismo, permitiendo el mantenimiento de la integridad de las membranas, disminuyendo las infecciones fúngicas y mejorando la conservación en frío y a temperatura ambiente (Yi y cols., 2008; Yi y cols., 2010; Wang y cols., 2013).





### 1.2.2. Modificaciones de la pared celular

El metabolismo de la pared celular también se ve afectado por las bajas temperaturas en especies sensibles. Uno de los principales polisacáridos componentes de la pared celular primaria, junto a la celulosa, son las pectinas, polímeros de ácido poligalacturónico. Los cambios producidos en las pectinas durante el almacenamiento en frío son los responsables de las alteraciones texturales que se producen en muchos frutos (Sevillano y cols., 2009). Las enzimas más importantes que se han relacionado con estas modificaciones son las poligalacturonasas y las pectin metilesterasas.

Las **poligalacturonasas** (PGs, EC 3.2.2.15) son las principales enzimas que despolimerizan las pectinas, hidrolizando los enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicos del ácido poligalacturónico. Atendiendo a su actividad, estas enzimas pueden ser: endo-PGs y exo-PGs. Las primeras catalizan la rotura de enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicos en el interior de los poligalacturonatos, dando lugar a oligómeros de ácido galacturónico. Las exo-PGs hidrolizan estos enlaces en los extremos de los poligalacturonatos liberando digalacturonatos (Qiu y Erickson, 1996). Las **pectin metilesterasas** (PMEs, EC 3.1.1.11) también actúan sobre las pectinas, catalizando la desmetilesterificación de los metilpoligalacturonatos, generando metanol y poligalacturonatos. Las pectinas desmetilesterificadas pueden ser hidrolizadas por las PGs (Pelloux y cols., 2007).

Respecto a la respuesta de estas enzimas frente al frío durante la postcosecha, existe cierta controversia en diversas especies. En algunos casos, el desarrollo de texturas anómalas en frutos de hueso sometidos a bajas temperaturas se ha relacionado con aumentos, disminuciones o desequilibrios entre ambas enzimas (Girardi y cols., 2005; Manganaris y cols., 2006; Cao y cols., 2010). En frutos de otras especies como tomate, también se han descrito discrepancias similares (Marangoni y cols., 1995; Rugkong y cols., 2011). Estos resultados parecen indicar que la actividad de estas enzimas en frutos conservados en frío puede depender de numerosos factores, además del propio estrés, como la variedad, el tipo de fruto, el estado de maduración del mismo y diversos factores previos a la cosecha (Brummell y cols., 2004). Ciertos tratamientos de mejora de la postcosecha en frío producen cambios en estas enzimas. En chirimoya, el tratamiento con CO<sub>2</sub> previo al almacenamiento a 6°C disminuye la acumulación de PG (Escribano y cols., 1997). La conservación de uvas en atmósferas enriquecidas en O<sub>2</sub>, mantiene la calidad de los frutos



conservados en frío disminuyendo la actividad PG y PME (Deng y cols., 2005). En otros tratamientos postcosecha la mejora se asocia a la regulación diferencial de estas enzimas (Cao y cols., 2010).

### 1.2.3. Inducción de estrés oxidativo y defensa antioxidante

El incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) se asocia con numerosos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004; Foyer y Noctor, 2005). Se ha visto que el estrés por frío aumenta los niveles de ROS en plantas, produciéndose un desequilibrio entre la producción y la detoxificación, que da lugar a un estrés oxidativo (Karpinski y cols., 2002). Las alteraciones causadas por el estrés oxidativo generado, que incluyen peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, inhibición de actividades enzimáticas, daño al ADN y al ARN, ha sido considerado una respuesta temprana de los tejidos sensibles expuestos a baja temperatura (Hariyadi y Parkin, 1991).

La defensa frente a las ROS incluye mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos están formados por las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y las que integran el ciclo ascorbato-glutatión: ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, deshidroascorbato reductasa y monodeshidroascorbato reductasa. También han sido consideradas parte de la defensa antioxidante algunas proteínas que limitan la producción de ROS, como la oxidasa alternativa (Mittler, 2002; Vanlerberghe, 2013), y enzimas cuya actividad genera poder reductor necesario para las reacciones de detoxificación, como son glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzimas málico, 6-fosfogluconato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa (Corpas y cols., 1998; Valderrama y cols., 2006; Leterrier y cols., 2012). Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran el ascorbato, el glutatión y los compuestos fenólicos.

#### a) Antioxidantes enzimáticos

Las **superóxido dismutasas** (SODs, EC 1.15.1.1) son metaloproteínas que catalizan la dismutación del anión superóxido formando peróxido de hidrógeno y oxígeno. Existen tres tipos de SOD dependiendo del grupo prostético metálico ligado a la enzima: cobre y zinc (Cu/Zn-SOD), hierro (Fe-SOD) y manganeso (Mn-SOD). Las Cu/Zn-SODs se localizan en cloroplastos,



peroxisomas y citosol, las Fe-SODs en cloroplastos y las Mn-SODs en mitocondrias y peroxisomas (Alscher y cols., 2002).

El estrés por bajas temperaturas incrementa la actividad SOD en plantas sensibles al frío como el pepino (Lee y Lee, 2000; Hu y cols., 2008). Sin embargo, también en especies sensibles, se ha asociado una mayor actividad SOD con los genotipos más tolerantes al frío (Jahnke y cols., 1991; Seppänen y Fagerstedt, 2000; Xu y cols., 2008). En muchos frutos que sufren DF, se ha visto un comportamiento similar: variedades más resistentes de mango y níspero tienen mayor actividad SOD (Cao y cols., 2011; Chongchatuporn y cols., 2013).

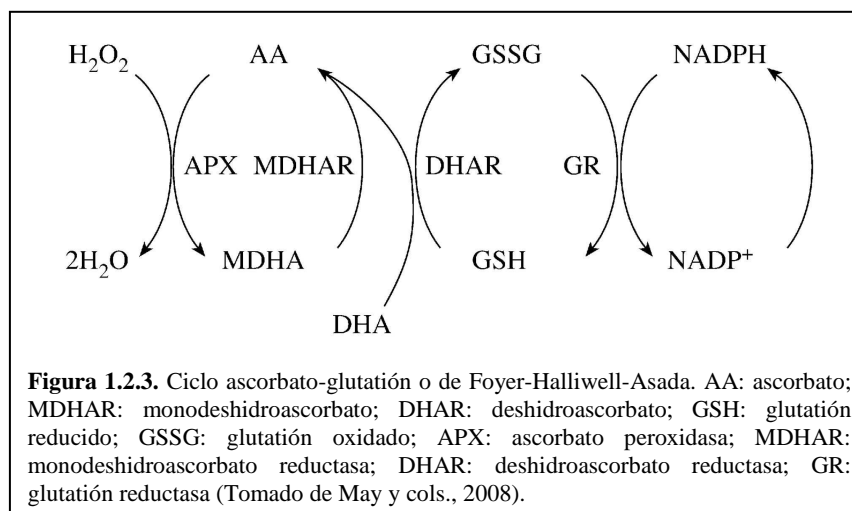
La enzima **catalasa** (CAT, EC 1.11.1.6) descompone dos moléculas de peróxido de hidrógeno en una de oxígeno y otra de agua. Se localiza de forma exclusiva en los peroxisomas (del Río y cols., 2006). Junto con la ascorbato peroxidasa, se distingue de otras enzimas detoxificadoras de  $H_2O_2$  por su elevada especificidad. Se han descrito distintas isoformas de CAT que se dividen en tres grupos atendiendo a su secuencia y estructura (Chelikani y cols., 2004; Mhamdi y cols., 2010). El primer grupo es el más extendido y lo constituyen CATs monofuncionales que presentan un grupo hemo como cofactor. El segundo lo forman proteínas bifuncionales que contienen un grupo hemo y que tienen una secuencia similar a las peroxidases, pudiendo actuar como catalasas y como peroxidases. El último grupo está integrado por CAT que no contienen grupo hemo sino Mn como cofactor. Las CATs del primer grupo pueden dividirse, a su vez, en tres clases dependiendo de sus patrones de expresión (Willekens y cols., 1995). Las CATs de clase I se encuentran fundamentalmente en tejidos fotosintéticos, las de clase II en tejidos vasculares y las de clase III en semillas y órganos florales.

En distintas especies y órganos expuestos a bajas temperaturas, la actividad CAT se ve inhibida por dicho estrés. En cítricos, se ha relacionado un incremento en la actividad CAT con la tolerancia al frío de los frutos tanto en variedades resistentes como en sensibles a las que se aplican distintos tratamientos que aumenten la tolerancia (Sala, 1998; Sala y Lafuente, 1999; Sala y Lafuente, 2000). Sin embargo, en otros trabajos con frutos susceptibles a los DF como es el plátano, la exposición al frío incrementa la expresión de genes que codifican CATs (Figuerola-Yáñez y cols., 2012).



Las **peroxidasas** (POD, EC 1.11.1.7) son un grupo diverso de enzimas que reducen el peróxido de hidrógeno a agua oxidando a su vez una amplia variedad de sustratos. En plantas existen dos grupos: las PODs de clase I, intracelulares y relacionadas con las de bacterias, y las PODs de clase III, que son secretadas al apoplasto (Duroux y Welinder, 2003). Las PODs de clase I son enzimas detoxificadoras de  $H_2O_2$  e incluyen ascorbato peroxidasa (APXs, EC 1.11.1.11), citocromo c peroxidasa (CcPs; EC 1.11.1.5) y catalasas-peroxidasa (CPs, EC 1.11.1.6) (Cosio y Dunand, 2009). Las PODs de clase III intervienen en numerosos procesos fisiológicos, como lignificación (Novo-Uzal y cols., 2013), suberización (Keren-Keiserman y cols., 2004) y procesos de senescencia (Yamauchi y cols., 2004), y en la defensa frente a patógenos (Daudi y cols., 2012; O'Brien y cols., 2012). Son enzimas que tienen gran importancia en postcosecha de frutos y vegetales debido a su implicación, junto con las polifenol oxidasas, en los procesos de pardeamiento (Página 19).

El **ciclo ascorbato-glutación** o de **Foyer-Halliwell-Asada** es uno de los principales sistemas antioxidantes en plantas (Figura 1.2.3). Se localiza en citosol, peroxisomas, mitocondria y plastos (Halliwell y Foyer, 1976; Foyer y cols., 1997). Comienza con la acción de la enzima ascorbato peroxidasa que utiliza el ascorbato (AA) para reducir el  $H_2O_2$  a agua formando monodeshidroascorbato. Este es reducido a ascorbato por la enzima monodeshidroascorbato reductasa con consumo de NAD(P)H. El monodeshidroascorbato también puede generar espontáneamente ascorbato y deshidroascorbato. Este deshidroascorbato es reducido por la enzima deshidroascorbato reductasa que utiliza glutatión (GSH) y NAD(P)H. El glutatión oxidado (GSSG) resultante es regenerado por la enzima glutatión reductasa que también requiere NAD(P)H (Halliwell y Foyer, 1976; Asada y Badger, 1984; Foyer y cols., 1997).



La **ascorbato peroxidasa** (APXs, EC 1.11.1.11) es una POD de clase I que utiliza el ascorbato como donador específico de electrones. Las distintas isoformas se encuentran distribuidas en el estroma (sAPX) y unidas a las membranas de los tilacoides (tAPX), asociadas a las membranas de glioxisomas y peroxisomas (mAPX), en el citosol (cAPX) y ligadas a las membranas de las mitocondrias (mitAPX) (Shigeoka y cols., 2002). La implicación de esta enzima en la defensa antioxidante bajo condiciones de estrés por bajas temperaturas ha sido muy estudiada. Se ha visto que la sobreexpresión de genes que codifican APXs aumenta la tolerancia a las bajas temperaturas en arroz (Sato y cols., 2011) y tomate (Wang y cols., 2005; Duan y cols., 2012). También se ha descrito un aumento de tanto de la actividad como de la expresión de esta enzima mediante distintos tratamientos inductores de tolerancia al frío tanto en plantas como en frutos (Wang, 1996; Sato y cols., 2001; Vicente y cols., 2006).

Las actividades de las enzimas **monodeshidroascorbato reductasa** (MDHAR, EC 1.6.5.4), **deshidroascorbato reductasa** (DHAR, EC 1.8.5.1) y **glutatión reductasa** (GR, EC 1.8.1.7) también han sido correlacionadas con la respuesta de las plantas al frío. La sobreexpresión en plantas de tomate de una MDHAR (Li y cols., 2010) incrementa la tolerancia a las bajas temperaturas aumentando los niveles de Ascorbato reducido. En frutos de tomate, también se ha asociado una mayor actividad MDHAR con el mantenimiento de niveles elevados de Ascorbato reducido y una menor incidencia de daños por frío (Stevens y cols., 2008; El Airaj y cols., 2013). En fresas tratadas con CO<sub>2</sub>, la



mejora de la respuesta al frío se relaciona con la mayor actividad GR que aumenta el contenido en GSH (Blanch y cols., 2013).

La producción de ROS puede disminuir mediante la actividad de las **oxidasas alternativas** presentes en la cadena de transporte electrónico mitocondrial de plantas (Mittler, 2002). Las oxidasas alternativas (AOXs, EC 1.10.3.11) pueden utilizar los electrones que proceden de la ubiquinona directamente para formar agua, desprendiendo la energía producida en el proceso como calor en lugar de formar ATP, que puede ayudar a la planta a reducir la producción de ROS en condiciones de estrés (Vanlerberghe, 2013). Diversos tratamientos postcosecha que mejoran la respuesta al frío de los frutos inducen la expresión de AOXs (Fung y cols., 2004; Fung y cols., 2006; Zheng y cols., 2008).

#### **b) Antioxidantes no enzimáticos**

El **ascorbato** (AA) o vitamina C es el antioxidante más abundante en las células vegetales que se encuentra en todos los compartimentos celulares (Smirnoff, 2000). Es un metabolito multifuncional y la mayoría de sus papeles derivan de su capacidad de actuar como agente reductor (Tóth y cols., 2013). Interviene en la eliminación enzimática de  $H_2O_2$ , mediante el ciclo ascorbato-glutación, pero también puede detoxificar ROS de forma directa siendo oxidado por el peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo, anión superóxido y oxígeno singlete dando lugar a monodeshidroascorbato (Smirnoff, 1996). En su biosíntesis están implicadas distintas rutas metabólicas, que se han denominado de acuerdo con la molécula precursora: L-galactosa, L-gulosa, mio-inositol y ácido D-galacturónico (Linster y Clarke, 2008).

El **glutación** (GSH) o  $\gamma$ -glutamyl-L-cisteínglicina es un tripéptido abundante en las células vegetales que, al igual que el AA, se encuentra en todos los compartimentos celulares. Se le han atribuido numerosas funciones, siendo la principal el mantenimiento del balance redox. De la misma forma que el AA, puede contribuir a la detoxificación de las ROS tanto enzimática, mediante el ciclo de Halliwell-Asada, como no enzimática, reaccionando directamente con algunas ROS. Se sintetiza mediante dos reacciones dependientes de ATP, catalizadas por la  $\gamma$ -glutamyl-L-cisteína sintetasa (ECS, EC 6.3.2.2) y la glutación sintetasa (GS, EC 6.3.2.3) (Noctor y Foyer, 1998).



Los **fenoles** son un amplio grupo de compuestos del metabolismo secundario que, por su estructura, presentan capacidad antioxidante. Ésta se basa en su alta reactividad como donadores de protones o electrones, y en su capacidad tanto de estabilizar y deslocalizar pares de electrones desapareados como de quelar iones metálicos (Rice-Evans y cols., 1997). Juegan un papel muy importante en la defensa de las plantas frente a estreses bióticos y abióticos como son la elevada intensidad lumínica, la radiación ultravioleta, el ataque de patógenos, las deficiencias nutricionales, las bajas temperaturas y el daño mecánico (Dixon y Paiva, 1995).

Se sintetizan por la acción de la enzima **fenilalanina amonio-liasa** (PAL, EC 4.3.1.5) que forma ácido *trans*-cinámico mediante la desaminación no oxidativa de la fenilalanina. Esta reacción inicia la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides. A partir del ácido cinámico, se forman un diverso grupo de compuestos del metabolismo secundario. La principal enzima responsable del catabolismo de los compuestos fenólicos es la **polifenol oxidasa** (PPO, EC 1.10.3.1). Cataliza la oxidación de monofenoles y *o*-difenoles formando *o*-quinonas. Las quinonas polimerizan de manera no enzimática generando polímeros complejos conocidos como melaninas. Junto con la actividad POD, esta enzima tiene gran relevancia en la postcosecha por estar relacionada con el desarrollo de pardeamientos. Estos procesos tienen lugar cuando la enzima entra en contacto con sus sustratos, que se encuentran en la vacuola, lo que puede ocurrir cuando se producen daños en dichas células (Yoruk y Marshall, 2003).

#### **1.2.4. Implicación de fitohormonas y reguladores del crecimiento**

##### **a) Etileno**

El etileno es una fitohormona que regula un gran número de procesos del crecimiento y desarrollo vegetal como la germinación de semillas, la diferenciación de órganos, la maduración de frutos, la abscisión y la senescencia (Bleecker y Kende, 2000). Se sintetiza a partir de la metionina que por la acción de la enzima SAM sintetasa (SAMS, EC 2.5.1.6) da lugar a S-adenosil-L-metionina (SAM). A partir de SAM, la enzima ACC sintasa (ACCS, EC 4.4.1.14) cataliza la formación del aminoácido cíclico ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que finalmente es oxidado por la ACC oxidasa (ACCO, EC 1.14.17.4) formando etileno (Yang y Hoffman, 1984).



Muchos estreses abióticos y bióticos inducen la producción de etileno, pudiendo dicha hormona controlarlos mecanismos de respuesta al estrés. Esta fitohormona está implicada en la incidencia y desarrollo de los daños por frío en muchos frutos y vegetales. Durante la frigoconservación, un incremento de los niveles de etileno se ha asociado al desarrollo de DF en numerosos frutos como aguacate (Pesis y cols., 2002), berenjena (Concellón y cols., 2005), ciruela (Candan y cols., 2008; Larrigaudière y cols., 2009), melón (Ben-Amor y cols., 1999) y pepino (Wang y Adams, 1982). Sin embargo, en otros, una mayor producción de etileno o la aplicación exógena del mismo previene o retrasa la aparición de DF. Es el caso de los frutos de mango tratados con ethrel antes del almacenamiento en frío, tratamiento que aumenta la producción de etileno y reduce los DF (Nair y Singh, 2003).

#### **b) Ácido abscísico**

El ácido abscísico (ABA) es un regulador del crecimiento y desarrollo de las plantas implicado en múltiples procesos fisiológicos. Es un sesquiterpeno apocarotenoide que se sintetiza a partir de la ruta de síntesis de los  $\beta$ -carotenoides. En primer lugar, se produce la epoxidación de la zeaxantina y de la anteraxantina a violaxantina por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP, EC 1.14.13.90). Después de distintas modificaciones estructurales, la violaxantina es convertida en diferentes 9-*cis*-epoxicarotenoides. La enzima 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED, EC 1.13.11.51) transforma el principal de estos compuestos, la 9-*cis*-neoxantina, en xantoxina. A partir de ella, se forma puede sintetizar ABA mediante tres vías: la del ácido xantónico, la del alcohol-abscísico y la del ABA aldehído, siendo esta última la más importante. En ella, la xantoxina es oxidada a ABA aldehído mediante la enzima deshidrogenasa/reductasa de alcoholes de cadena corta. Finalmente el ABA aldehído es oxidado a ABA gracias a la ABA aldehído oxidasa (AAO, EC 1.2.3.14) (Xiong y Zhu, 2003). El catabolismo del ABA se produce principalmente por oxidación y conjugación.

El ABA es crucial en la respuesta de las plantas a estreses ambientales como la sequía, la salinidad y el frío. En especies sensibles al frío, los niveles de ABA incrementan cuando son expuestas a bajas temperaturas. Este aumento ha sido atribuido a un efecto directo frente a este estrés, pero también podría ser una consecuencia del estrés hídrico que se genera bajo estas condiciones. También se ha considerado que tiene una función protectora induciendo





tolerancia al frío, estabilizando las membranas y regulando la acumulación de prolina (Chen y Li, 2002). En frutos sensibles al frío, el ABA presenta diferentes respuestas dependiendo de la especie. En mandarinas, no se correlacionó el contenido de ABA con la susceptibilidad al desarrollo de DF (Lafuente y cols., 1997). En frutos de pimiento, en cambio, un mayor contenido en ABA se ha asociado con la aparición de DF (Serrano y cols., 1997).

### c) **Ácido jasmónico**

El ácido jasmónico (AJ) y su metil éster, jasmonato de metilo (MeJA), regulan la expresión de numerosos genes influyendo en aspectos específicos del crecimiento, desarrollo y respuestas a estreses bióticos y abióticos de las plantas (Wasternack y Parthier, 1997). Su síntesis se inicia con la formación de ácido 13-hidroperoxilinoico a partir de de ácido linoleico por la acción de la enzima lipoxigenasa (Creelman y Mullet, 1997).

Durante la frigoconservación postcosecha, el tratamiento con AJ o MeJA mejora la tolerancia al frío en níspero (Cao y cols., 2009a; Cai y cols., 2011), plátano (Zhao y cols., 2013), pimiento (Fung y cols., 2004) y tomate (Ding y cols., 2001; Ding y cols., 2002; Fung y cols., 2006).

### d) **Ácido salicílico**

El ácido 2-hidroxibenzoico o ácido salicílico (AS) es un compuesto fenólico implicado en la regulación de la expresión génica durante los procesos de patogénesis, en la resistencia sistémica adquirida y en la respuesta hipersensible, así como en algunos cambios que se producen en relación con estreses abióticos, incluyendo el estrés por frío. Puede ser sintetizado a partir del isocorismato o del ácido *trans*-cinámico. La primera vía comienza con la isomerización corismato a isocorismato por la isocorismato sintasa (ICS, EC 5.4.4.2) terminando con la ruptura del mismo en piruvato y AS. En la segunda, el ácido *trans*-cinámico producido por la PAL es oxidado a ácido benzoico. A continuación, la enzima ácido benzoico 2-hidroxilasa (BA2H, EC) forma el AS (Wildermuth y cols., 2001).

El tratamiento con AS exógeno induce tolerancia al frío en distintas especies. En plantas de maíz, sandía y uva, esta respuesta se debe al incremento de la defensa antioxidante (Janda y cols., 1999; Wang y Li, 2006; Jing-Hua y cols., 2008). De la misma forma, la aplicación de AS en frutos mejora la respuesta a la frigoconservación en melocotón (Wang y Li, 2006), naranjas



(Huang y cols., 2008), pimiento (Fung y cols., 2004) y tomate (Ding y cols., 2001; Ding y cols., 2002; Fung y cols., 2006).

#### e) Poliaminas

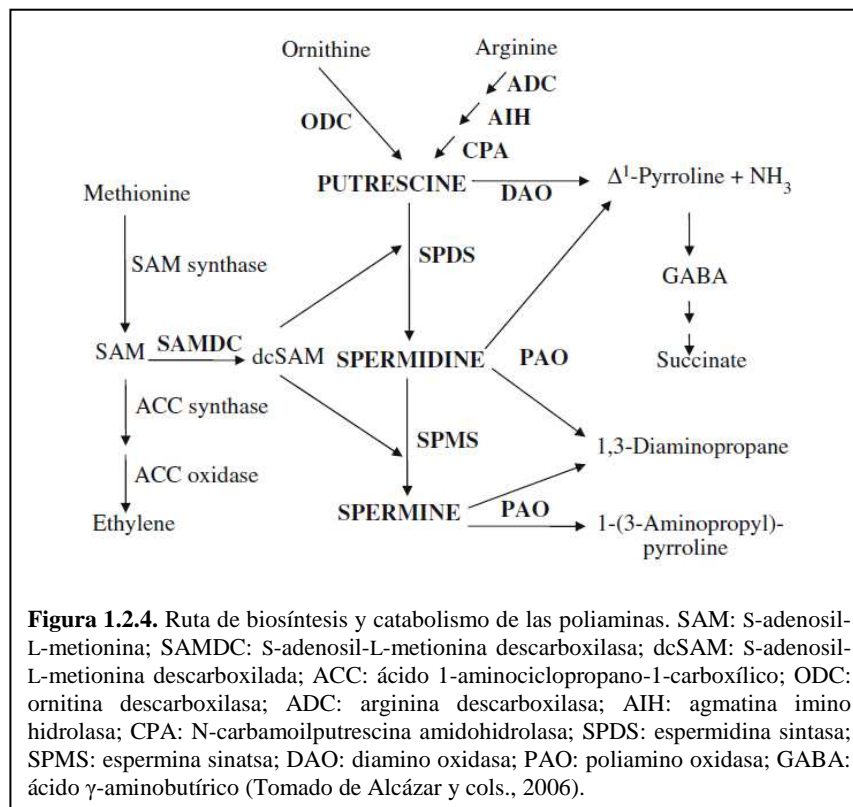
Las poliaminas (PAs) son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que intervienen en numerosos procesos fisiológicos como son la organogénesis, embriogénesis, desarrollo y maduración de frutos (Alcázar y cols., 2006; Kusano y cols., 2008; Alcázar y cols., 2010). Las PAs más abundantes son: putrescina (Put; 1,4-diaminobutano), espermidina (Spd; N-(3-aminopropil) 1,4-diamino butano) y espermina (Spm; NN'-bis-(3-aminopropil) 1,4-diamino butano). Las poliaminas pueden encontrarse libres, conjugadas solubles, cuando se une a fenoles y ácidos nucleicos, o conjugadas insolubles, cuando se unen a proteínas.

La síntesis de las principales PAs se recoge en la Figura 1.2.4. Existen dos vías de síntesis de Put: directa, mediante descarboxilación de la L-ornitina por la acción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17), e indirecta, a partir de L-arginina por la arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19). Ésta forma agmatina que dará lugar a Put mediante dos reacciones catalizadas por las enzimas agmatina iminohidrolasa (AIH, EC EC 3.5.3.12) y N-carbamoylputrescina amidohidrolasa (CPA, EC 3.5.1.53). Spd y Spm se forman de manera secuencial por la adición de grupos aminopropilo a Put y Spd respectivamente, por las actividades espermidina sintasa (SpdS, EC 2.5.1.16) y espermina sintasa (SpmS, EC 2.5.1.22). Los grupos aminopropilo derivan de la metionina vía SAM y dcSAM por acción de las enzimas SAM sintetasa (SAMS, EC EC 2.5.1.6) y SAM descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50). Las PAs son degradadas mediante desaminación oxidativa llevada a cabo por las enzimas diamino oxidasa (DAO, EC 1.4.3.22) y poliamino oxidasa (PAO, EC 1.5.3.11).

Las PAs intervienen en la respuesta de las plantas frente a situaciones de estrés biótico y abiótico. A pH celular, se encuentran en forma catiónica, lo que les permite unirse a macromoléculas aniónicas como ADN, ARN, fosfolípidos y proteínas, estimulando la replicación, transcripción y traducción, y estabilizando las membranas (Galston y Kaur-Sawhney, 1990; Heby y Persson, 1990). También ha sido descrita su capacidad de detoxificar radicales libres (Drolet y cols., 1986). En el caso de estrés por bajas temperaturas, la implicación de las PAs ha sido muy estudiada. La acumulación de Put en



*Arabidopsis* se relaciona con tolerancia a la congelación (Cuevas y cols., 2008). Durante la frigoconservación de muchos frutos susceptibles a los DF, tiene lugar un incremento de los niveles de Put. Esta respuesta ha sido descrita en calabacín, limón, pomelo y pimiento (McDonald y Kushad, 1986; Wang, 1994; Serrano y cols., 1998).



#### f) Ácido $\gamma$ -aminobutírico

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido no proteico que se acumula en respuesta a diversos estreses abióticos. Se sintetiza en el citosol a partir de glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD; EC 4.1.1.15). El GABA también puede formarse de manera indirecta a partir del catabolismo de las PAs (Figura 1.2.4). Spd y Spm pueden formar Put mediante la actividad PAO. La enzima DAO degrada la Put a 4-aminobutiraldehído que puede formar  $\Delta^1$ -pirrolina. Ambos compuestos originan GABA mediante la



actividad 4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (ABADH, EC 1.2.1.19) y pirrolina deshidrogenasa (PDH, EC 1.5.1.35) (Shelp y cols., 2012). El GABA es transportado a la mitocondria donde es transformado por la GABA transminasa (GABA-T; EC 2.6.1.19) en succinato semialdehído, que pasa succinato por acción de la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH; EC 1.2.1.24). El succinato participa en la generación de ATP y poder reductor mediante el ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs (Fait y cols., 2008).

El GABA puede intervenir en la defensa frente a estreses bióticos, en la osmorregulación y como molécula señal, su catabolismo se relacionan con la protección frente al estrés oxidativo gracias a la producción de poder reductor (Bouché y Fromm, 2004). Durante la postcosecha, se ha descrito una menor incidencia de DF mediante tratamientos con GABA en melocotones y plátanos (Shang y cols., 2011; Yang y cols., 2011; Wang y cols., 2014). También se ha visto que distintos tratamientos que mejoran la respuesta de los frutos al frío incrementan los niveles de GABA (Merodio y cols., 1998; Cao y cols., 2012).

### **1.2.5. Metabolitos relacionados con el estrés**

#### **a) Prolina**

La prolina (Pro) es un aminoácido cuya acumulación en respuesta a estreses ambientales ha sido descrita en numerosos estudios. En plantas, puede ser sintetizada mediante dos vías (Kishor y cols., 2005). La vía principal se inicia a partir de glutamato que pasa a glutamato semialdehído (GSA) por la enzima pirrolina 5-carboxilato sintetasa (P5CS; EC 1.2.1.41). Mediante ciclación espontánea, se forma pirrolina 5-carboxilato (P5C) a partir de glutamato semialdehído. Finalmente, la enzima pirrolina 5-carboxilato reductasa (P5CR; EC 1.5.1.2) reduce la pirrolina 5-carboxilato formando prolina. La vía alternativa de síntesis de prolina, comienza con la acción de la enzima ornitina- $\delta$ -aminotransferasa (OAT; EC EC 2.6.1.13) que transamina la ornitina produciendo GSA y P5C que pasa a Pro. Su catabolismo se produce por la acción secuencial de las enzimas prolina deshidrogenasa (PDH; EC 1.5.99.8) o P5CR que generan P5C, que pasa después a glutamato por la acción de la glutamato semialdehído deshidrogenasa (P5CDH; EC 1.2.1.88) (Szabados y Saviouré, 2010).

Puede tener distintas funciones en la tolerancia al estrés, interviniendo como regulador del ajuste osmótico, estabilizando proteínas de membrana,

---



induciendo la expresión de genes de respuesta al estrés osmótico y detoxificando ROS (Hare y Cress, 1997). La relación entre sus niveles y el aumento de tolerancia frente al estrés puede depender de la especie estudiada y del estrés aplicado. En *Arabidopsis*, la transcripción de genes implicados en el metabolismo de aminoácidos se ve afectada por el estrés por frío, con incremento de la expresión de genes de las dos vías de biosíntesis de Pro, mientras que los genes responsables de la degradación de este aminoácido se encuentran inhibidos (Kaplan y cols., 2007).

Existen pocos trabajos que estudien los cambios en los niveles de prolina en frutos durante la postcosecha de los mismos. Zhao y cols. (2009), analizando variedades de tomate con distinto grado de tolerancia al frío, describen un mayor contenido en prolina en los frutos de la variedad más tolerante. También en tomates, se ha visto que la aplicación de arginina reduce el desarrollo de daños por frío e incrementa el contenido en prolina (Zhang y cols., 2010b). En frutos de mango, melocotón y níspero, algunos tratamientos que mejoran la tolerancia al frío también incrementan los niveles de prolina (Shang y cols., 2011; Cao y cols., 2012; Li y cols., 2014).

#### **b) Glicina-betaína**

En plantas, la glicina-betaína (GB) se sintetiza a partir de la oxidación de la colina. La primera oxidación es llevada a cabo por la enzima colina monooxigenasa (CMO, EC 1.14.15.7) que forma betaína aldehído a partir de colina. La segunda oxidación la realiza la betaína aldehído deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  (BADH, EC 1.2.1.8) que sintetiza GB (Chen y Murata, 2011).

La GB se acumula en plantas en respuesta a diferentes estreses abióticos (Ashraf y Foolad, 2007; Chen y Murata, 2008). Al igual que en el caso de la Pro, la correlación del contenido de GB con la tolerancia al estrés puede variar en función de la especie y del estrés estudiado. En relación con el estrés por frío, se ha descrito un aumento de la tolerancia al mismo en plantas de tomate tratadas con glicina-betaína debido a la inducción de enzimas desaturasas y lipoxigenasas (Karabudak y cols., 2014). A pesar de existir un gran número de trabajos realizados en plantas, no se ha estudiado la implicación de este metabolito en las alteraciones que se producen en la postcosecha de frutos y vegetales.



### 1.2.6. Regulación de la expresión génica

Mediante estudios transcriptómicos han identificado genes cuya expresión se induce bajo estreses abióticos, que pueden clasificarse en dos grupos. El primer grupo corresponde a genes implicados en la producción de moléculas que protegen directamente las células vegetales frente a los efectos adversos del estrés. El segundo grupo lo constituyen genes que regulan la expresión génica y la transducción de señales en respuesta al estrés (Shinozaki y cols., 2003). El frío origina cambios en los niveles de expresión de un número de genes conocidos como genes de respuesta al frío o *COR* (*Cold Responsive genes*). Estos genes codifican proteínas relacionadas con la tolerancia al frío o con la transducción de señales en respuesta al mismo como son las proteínas *COR*, *LEA* (*Late Embryogenesis Abundant proteins*), desaturasas, dehidrasas, chaperonas, proteínas de choque térmico (*HSP*), *MAP* kinasas y proteínas 14-3-3, entre muchas otras (Thomashow, 1999).

En la regulación de la transcripción de proteínas frente a estreses abióticos intervienen distintos factores de transcripción. Éstos se pueden dividir en cuatro grupos atendiendo a sus respectivos regulones: regulón **CBF/DREB** (*C-repeat Binding Factors/ Dehydration-Responsive Element-Binding protein*), regulón **NAC** (*NAM, No Apical Meristem; ATAF, Arabidopsis Transcription Activation Factor*; y **CUC**, *CUp-shaped Cotyledon*) y **ZF-HD** (*Zinc-Finger Homeodomain*), regulón **AREB/ABF** (*ABA-Responsive Element-Binding protein/ABA-Binding Factor*) y regulón **MYC/MYB** (*MYeloCytomatosis y MYeloBlastosis oncogene*) (Saibo y cols., 2009).

Existen pocos trabajos que estudien los mecanismos de regulación de la respuesta al frío durante la postcosecha de frutos. En tomates, un incremento en la expresión de genes *CBFs* se ha relacionado con una mayor tolerancia al frío (Zhao y cols., 2009). Estos autores también han descrito la un aumento de expresión de estos genes al aplicar tratamientos que mejoran el proceso de frigoconservación de los frutos (Zhao y cols., 2011). En uvas, el tratamiento con  $\text{CO}_2$  previo al almacenaje en frío produce un aumento de tolerancia relacionado con un aumento de expresión de genes *CBFs* (Fernández-Caballero y cols., 2012). De la misma forma, la respuesta al tratamiento con MeJA exógeno se ha asociado con el incremento de la expresión de factores de transcripción tipo *MYC* en plátano (Zhao y cols., 2013).



### **1.3. Tratamientos postcosecha que reducen los daños por frío en frutos y vegetales**

Aunque la refrigeración tiene efectos negativos para gran cantidad de frutos y vegetales, es la técnica de conservación más empleada. De esta forma, se prolonga la vida comercial y se mantiene la calidad del producto debido a que ralentiza el metabolismo celular, disminuyendo la tasa respiratoria y paralizando los procesos de maduración y senescencia (Sevillano y cols., 2009). Para minimizar los efectos negativos del frío, se han desarrollado distintos tratamientos inductores de tolerancia. Estos tratamientos pueden ser agrupados, atendiendo a su naturaleza, en físicos y químicos.

#### **1.3.1. Tratamientos físicos**

Una de las ventajas que presentan estos tratamientos frente a los químicos es la mayor aceptación por parte del consumidor. Se han desarrollado numerosos tratamientos que han resultado eficaces en la reducción de la incidencia de los DF. Los más empleados se basan en la modificación de la atmósfera en la que se conserva el producto, en la aplicación de tratamientos con O<sub>2</sub> y/o CO<sub>2</sub> o en cambios de temperatura previos al almacenaje. Otros tratamientos utilizados son las altas presiones hidrostáticas, radiación UV-B y UV-C.

##### **a) Atmósferas controladas y modificadas**

El empleo de atmósferas modificadas (AM) consiste en utilizar una atmósfera de composición diferente a la del aire normal en el ambiente que rodea al fruto. Las atmósferas controladas (AC) son aquellas en las que la composición del aire que rodea al fruto está estrictamente controlada. Ambas tecnologías se fundamentan en la reducción de la concentración de O<sub>2</sub> y/o en el aumento los niveles de CO<sub>2</sub>. Las concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> tienen que adecuarse a los niveles de tolerancia de cada especie para que no resulten nocivas. La principal ventaja de las AM/AC es la prevención de la maduración de los frutos y los cambios que ésta conlleva. También reducen la tasa respiratoria y la producción de etileno (Kader y cols., 1989). Estas características hacen que reduzcan la incidencia de DF en frutos sensibles, además de prolongar la vida útil de los mismos. Las AM/AC tienen efectos positivos reduciendo los DF y prolongando la vida comercial en frutos de



diversas especies como ciruelas japonesas (Singh y Singh, 2013) y granadas (Selcuk y Erkan, 2014). El almacenaje en atmósferas tanto empobrecidas como enriquecidas en O<sub>2</sub> mejora la respuesta a la conservación refrigerada, relacionándose con cambios en los niveles de PAs, y con un aumento de la defensa antioxidante respectivamente (Wang y Ji, 1989; Zheng y cols., 2008).

#### **b) Tratamientos con CO<sub>2</sub>**

Otro tratamiento utilizado, relacionado con las AM/AC, consiste en aplicar altas concentraciones CO<sub>2</sub> de forma previa al almacenamiento en frío. Este tratamiento es efectivo tanto en la reducción del desarrollo de DF como en la disminución de la incidencia de enfermedades fúngicas. La mejora de la respuesta al frío mediante este tratamiento ha sido descrita en frutos de uva (Sánchez-Ballesta y cols., 2007; Romero y cols., 2008b; Blanch y cols., 2011; Rosales y cols., 2013), chirimoya (Merodio y cols., 1998; Maldonado y cols., 2002; Maldonado y cols., 2004) y fresa (Blanch y cols., 2012a). Este tipo de tratamiento regula en uvas y chirimoyas la acumulación de proteínas quitinasas y glucanasas con actividad crioprotectora (Romero y cols., 2008a; Goñi y cols., 2009; Goñi y cols., 2010; Goñi y cols., 2011). En fresas, se ha visto que disminuye la pérdida de peso, mantiene la integridad celular (Blanch y cols., 2012b). También se ha descrito un aumento de la tolerancia al frío mediante la aplicación de CO<sub>2</sub> previa al almacenaje en frutos de calabacín, afectando al contenido en PAs (Serrano y cols., 1998).

#### **c) Tratamientos con térmicos**

Los tratamientos con altas temperaturas comenzaron a aplicarse para reducir el ataque de insectos y prevenir las contaminaciones fúngicas (Lurie, 1998). Además de controlar las enfermedades postcosecha, mejoran la respuesta de los frutos cuando son conservados en frío y ayudan a mantener la calidad de los mismos. Esta respuesta puede deberse a que la exposición a temperatura elevada induce la expresión de proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein*, HSP) o proteínas de estrés. Juegan un papel fundamental como chaperonas, además de prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas y promover la renaturalización de proteínas agregadas. Debido a ello, están relacionadas con los mecanismos de resistencia frente a diversos tipos de estrés. Las HSPs se clasifican en cinco familias atendiendo a su peso molecular: HSP100, HSP90, HSP70 y HSP de bajo peso molecular (smHSP). En frutos de





ciruela (Sun y cols., 2010), chirimoya (Sevillano y cols., 2010), plátano (He y cols., 2012), pomelo (Rozenzvieg y cols., 2004), tomate (Sabehat y cols., 1996; Sabehat y cols., 1998; Polenta y cols., 2007) y uva (Zhang y cols., 2005), se ha asociado una acumulación de HSPs con el aumento de la tolerancia al frío mediada por la aplicación de tratamientos térmicos.

También ha sido demostrada la eficacia de la aplicación de tratamientos con bajas temperaturas en la mejora de la posterior conservación en frío de algunos frutos. Estos tratamientos consisten en un choque térmico a baja temperatura durante un corto periodo de tiempo y pueden prolongar vida comercial de los frutos refrigerados porque disminuyendo la tasa metabólica, suprimen la maduración, cambian la composición de las membranas y aumentan los mecanismos de defensa antioxidante (Goto y cols., 1984; Inaba y Philip, 1986; Zhao y cols., 2006). Zhang y cols. (2010a) han visto una disminución del ablandamiento que se produce en plátanos conservados en frío en relación con la menor actividad poligalacturonasa y pectin metilesterasa inducida por el tratamiento con frío. También en vegetales, como el brócoli, este tratamiento se han asociado con un aumento de la defensa antioxidante (Zhang y cols., 2009).

#### **d) Preacondicionamientos a temperaturas moderadas**

Muchas especies sensibles al frío pueden adaptarse al mismo mediante un proceso de aclimatación a temperatura moderada. Este proceso da lugar a la protección y estabilización de las membranas celulares, aumento de la defensa antioxidante e incremento de los niveles intracelulares de compuestos con función protectora como azúcares, poliaminas y prolina (Mahajan y Tuteja, 2005). De la misma forma, frutos de origen tropical y subtropical, susceptibles a desarrollar DF, presentan la misma respuesta cuando se preacondicionan antes de la frigoconservación. En calabacín, este tratamiento afecta positivamente al mantenimiento en frío de los frutos, reduciendo los DF y aumentando los mecanismos de detoxificación de ROS (Wang, 1994; Wang, 1995a; Wang, 1995b; Wang, 1996). El preacondicionamiento de kiwis también incrementa la actividad de distintas enzimas antioxidantes, lo que hace disminuir las ROS y los DF (Yang y cols., 2013). En frutos de pomelo, este tratamiento induce la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico y oxidativo, como desaturasas y catalasas (Sapitnitskaya y cols., 2006; Maul y cols., 2008; Maul y cols., 2011).



### 1.3.2. Tratamientos químicos

El uso de algunas sustancias vegetales, como pueden ser los reguladores del crecimiento vegetal durante la cosecha y postcosecha, puede inducir cambios en el metabolismo de los frutos, lo que puede afectar a la respuesta de dichos frutos frente a la conservación en frío.

#### a) Etileno y 1-MCP

A pesar de inducir los procesos de maduración y senescencia, la aplicación exógena de etileno sobre algunos frutos, como mandarinas y nectarinas, se ha demostrado que reduce la aparición de daños por frío en los mismos (Lafuente y cols., 2001; Zhou y cols., 2001; Lafuente y cols., 2004). Sin embargo, para muchos otros frutos, la inducción de tolerancia al frío se consigue mediante la aplicación del inhibidor de su percepción 1-metilciclopropano (1-MCP) (Candan y cols., 2008; Cao y cols., 2009b; Larrigaudière y cols., 2009).

#### b) Poliaminas

Los tratamientos con PAs exógenas pueden minimizar el desarrollo de daños por frío en frutos sensibles. Estas moléculas pueden actuar inhibiendo la producción de etileno, estabilizando las membranas, detoxificando ROS y regulando la expresión génica. En frutos de calabacín, Martínez-Téllez y cols. (2002) han descrito una mejora de la respuesta al frío mediante infiltración de Put, Spd y Spm que hacen la actividad PG. En albaricoques, el tratamiento con PAs reduce los DF incrementando la defensa antioxidante (Koushesh saba y cols., 2012). Los tratamientos con Put y Spd también se ha visto que son eficaces para el mantenimiento de la calidad de uvas almacenadas en frío (Champa y cols., 2014).

#### c) Ácido jasmónico y salicílico

La aplicación exógena de ácido jasmónico, salicílico o sus ésteres, jasmonato y salicilato de metilo, como tratamientos para prevenir la aparición de DF ha sido también muy estudiada. Se ha descrito en calabacín una mejora de la respuesta al frío mediante aplicación exógena de MeJA, en relación con los contenidos en PAs y azúcares solubles (Wang y Buta, 1994; Wang y Buta, 1999). El tratamiento con estos compuestos también puede inducir la expresión de proteínas de defensa así como de HSP de forma similar a un tratamiento térmico. En tomates, los tratamientos con MeJA y MeSA, que mejoran la



---

tolerancia al frío, inducen a su vez la acumulación de smHSPs y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, *Pathogenesis-Related Proteins*) (Ding y cols., 2001; Ding y cols., 2002). En frutos de pimiento y tomate, los tratamientos con MeJA y MeSA incrementan la tolerancia a las bajas temperaturas y aumentan la transcripción de genes que codifican para la oxidasa alternativa, (Fung y cols., 2004; Fung y cols., 2006). La regulación de la respuesta al tratamiento con MeJA exógeno ha sido asociada con el incremento factores de transcripción tipo MYC en plátano (Zhao y cols., 2013).



## *Introducción*

---

## **2.OBJETIVOS**







---

Los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Estudiar el proceso de frigoconservación del fruto de *Cucurbita pepo* L morfotipo Zucchini, analizando enzimas y metabolitos que puedan estar implicados, por un lado, en la adquisición de daños por frío y, por otro, en la resistencia, obteniendo de esta manera marcadores fisiológicos a la hora de evaluar la calidad de un fruto
2. Analizar la respuesta a la conservación en frío de frutos de distintas variedades comerciales cultivadas en la provincia de Almería, con la finalidad de seleccionar variedades más y menos tolerantes al frío, que puedan servir para posteriores estudios.
3. Comparar la postcosecha en frío de los frutos de variedades más y menos tolerantes.
4. Seleccionar y estudiar tratamientos que permitan mejorar la calidad de los frutos de calabacín durante su almacenamiento en frío, incluso en variedades tolerantes.



## *Objetivos*

---



### **3.MATERIAL Y MÉTODOS**







## 3.1. MATERIAL VEGETAL Y TRATAMIENTOS

### 3.1.1. Material vegetal

En este trabajo, se utilizaron frutos de tamaño comercial de distintas variedades híbridas de calabacín (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* morfotipo zucchini) cultivados en la provincia de Almería y proporcionados por las empresas Mayes Exportación S.L. y Hermanos Femago S.L. Las variedades analizadas fueron Capea (Clause-Tezier), Cónsul (Seminis), Diamante (Diamond Seeds), Milenio (Semillas Fitó), Natura (Enza Zaden) y Sinatra (Clause-Tezier). El primer estudio se realizó con frutos de calabacín de las principales cosechas que se realizan en esta provincia: otoño, invierno y primavera. Los datos presentados en el primer capítulo corresponden con los resultados obtenidos en la cosecha de invierno por ser la época de recolección en la que se encontró una mayor calidad y homogeneidad de los frutos. Los demás experimentos se realizaron con frutos cosechados en esta época del año.

### 3.1.2. Tratamientos

En los ensayos con variedades, los frutos recién cosechados se conservaron durante 7 y 14 días a 4, 12 y 20°C. Después del almacenamiento, los frutos se sometieron a un periodo de aclimatación a 20°C durante 24 h. Los análisis bioquímicos se realizaron con los frutos almacenados a 4 y 20°C.

Los tratamientos químicos se realizaron con frutos de la variedad Sinatra. Los compuestos empleados fueron etileno, 1-MCP, jasmonato de metilo (MeJA), putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm). Las dos dosis de etileno empleadas fueron 50 y 200  $\mu\text{L L}^{-1}$  y la aplicación se realizó durante 48 h a 12°C en contenedores herméticos. Las dosis de 1-MCP utilizadas fueron 600 y 2400  $\mu\text{L L}^{-1}$  y se aplicaron de la misma forma que el etileno. La aplicación de 0.01 y 0.1 mM de MeJA, y 1 mM de las poliaminas Put, Spd y Spm se hizo por inmersión en baño durante 20 min a temperatura ambiente. Después de los tratamientos, los frutos se conservaron 14 días a 4°C tras lo que el material se recogió y conservó a -20 o -80°C.

Para los tratamientos físicos se emplearon frutos de las variedades Diamante, Milenio, Natura y Sinatra. Los tratamientos aplicados fueron un tratamiento térmico, consistente en inmersión en baño de agua a 42°C durante 30 min, y un tratamiento de preacondicionamiento de los frutos a 15°C durante



48 h. También se estudió el efecto combinado de ambos tratamientos. Los frutos se conservaron a 4°C después de los tratamientos. El material se recogió directamente del frío pasados 7, 14 ó 21 días dependiendo del ensayo.

En cada experimento, se realizaron 3 réplicas biológicas para cada condición de almacenamiento o tratamiento formadas por 5 ó 6 frutos cada una, dependiendo del ensayo. En todos los casos, el material se recolectó separando el exocarpo del mesocarpo y endocarpo de cada fruto, mezclando el de los distintos frutos que constituían cada réplica biológica y macerando en N<sub>2</sub> líquido. Las muestras se conservaron a -20 y -80°C.

## 3.2. ANÁLISIS FISIOLÓGICOS

### 3.2.1. Pérdida de peso

La pérdida de peso de cada fruto se calculó mediante la diferencia entre el peso inicial y final, y se expresó en porcentaje de pérdida.

### 3.2.3. Índice de daños por frío

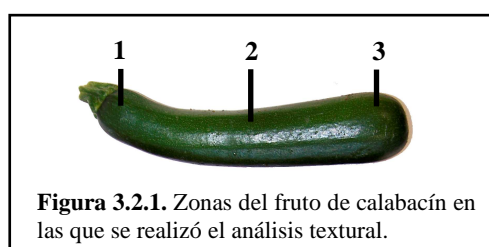
El índice de daños por frío (DF) se evaluó utilizando la escala basada en síntomas visuales descrita por Martínez-Téllez y cols. (2002). A cada fruto se le asignó un valor: 0 (sin daños), 1 (<10% de la superficie afectada), 2 (10-20% de la superficie afectada) y 3 (>20% de la superficie afectada). El índice se calculó como:  $\Sigma$  (valor de la escala (0-3) x número de frutos de cada valor)/número de frutos evaluados.

### 3.2.4. Parámetros texturales

La textura de los frutos se analizó en un texturómetro Stable Microsystem TA-XT2i Plus con el programa Texture Expert for Windows version 1.0 (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, U.K.). Se realizó un ensayo de penetración con una sonda cilíndrica de 4 mm de diámetro (P/4) en tres zonas del fruto: zona peduncular (zona 1), zona media (zona 2) y zona próxima al cierre pistilar (zona 3), como se indica en la Figura 3.1.1. La velocidad de penetración de la sonda fue de 2 mm s<sup>-1</sup> y la profundidad de 10 mm. Los parámetros estudiados fueron: fracturabilidad, dureza, fuerza y adhesividad. La fracturabilidad corresponde a la fuerza que tiene que ejercer la



sonda para atravesar la superficie del fruto. La dureza es la fuerza media que tiene que ejercer la sonda para penetrar 10 mm en el mesocarpo del fruto manteniendo una velocidad constante. La dureza es la fuerza final ejercida por la sonda durante la penetración. Finalmente, la adhesividad es la fuerza con la que se adhiere el mesocarpo a la sonda. Los parámetros texturales se expresaron en Kg excepto la adhesividad, cuya unidad fue Kg s.



**Figura 3.2.1.** Zonas del fruto de calabacín en las que se realizó el análisis textural.

### 3.2.5. Pérdida de electrolitos

La pérdida de electrolitos fue determinada en el material fresco según Mao y cols. (2007). Con la ayuda de un sacabocados, se hicieron discos de exocarpo, separado del mesocarpo y endocarpo. Para cada repetición técnica se tomaron 10 discos y se lavaron 3 veces con agua destilada durante 3 min. Se incubaron a temperatura ambiente en agitación a 150 rpm en 50 mL de agua destilada. Pasados 30 min, se midió la conductividad de la solución con conductímetro Consort C860 equipado con un electrodo Consort SK10T (Consort nv, Bélgica). Para obtener conductividad máxima, los discos se hirvieron 10 min en la solución de incubación y se volvió a medir la conductividad de la misma tras enfriarse a temperatura ambiente. La pérdida de electrolitos de las muestras se calculó como porcentaje respecto al valor de la conductividad máxima.

### 3.2.6. Microscopía óptica

Se fijaron cubos de exocarpo de 2 mm de lado en una solución de formaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en tampón PBS pH 7.4 compuesto por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3 mM y NaCl 0.13 M. Las muestras se mantuvieron en la solución fijadora a 4°C durante 72 h, cambiando el fijador cada 24 h. Pasadas las 72 h, se eliminó el fijador y se lavó el material tres veces



durante 30 min a 4°C con tampón PBS. Después se procedió a su deshidratación a temperatura ambiente en un gradiente creciente de etanol: 50, 70, 90 y 100%, manteniendo las muestras 20 min en cada solución.

La inclusión del material se realizó en la resina Epoxi Embed 812, pasando las muestras por las siguientes soluciones:

- Etanol 100% : resina (3:1) 1 h
- Etanol 100% : resina (1:1) 1 h
- Etanol 100% : resina (1:3) 1 h
- Resina pura 16 h

Las muestras se montaron en el fondo del molde de inclusión, que contenía una gota de resina y se orientaron en la posición adecuada, añadiendo resina hasta rellenar la cápsula. La polimerización de la resina se realizó a 37°C durante 24 h y a 60°C durante 24 h. Los cortes semifinos de aproximadamente 1.5  $\mu\text{m}$ , se obtuvieron con un Ultramicrotomo Ultracut R de Reichert Jung del CIC de la Universidad de Granada. Los moldes de inclusión se tallaron en forma de trapecio en la zona que contenía el material vegetal. Los cortes se realizaron con una cuchilla de vidrio y se recogieron en seco con pincel. Los cortes se colocaron en un portaobjetos sobre una gota de agua. Los portaobjetos se calentaron sobre una placa calefactora hasta que los cortes se secaron y quedaron adheridos al portaobjetos.

La tinción de los cortes se realizó con una solución de azul de metileno al 0.5% (p/v) y azul de toluidina al 0.5% (p/v) en bórax al 1% (p/v). Se añadieron unas gotas de colorante sobre el portaobjetos, se dejó penetrar 1 ó 2 min y se eliminó el exceso de colorante lavando con agua. Las muestras se observaron con un microscopio Olympus BX41 acoplado a una cámara digital Olympus DP70 con la que se obtuvieron las fotografías.

### **3.2.7. Microscopía electrónica de barrido**

Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1 M pH 7 y se mantuvieron en el fijador a 4°C durante 48 h, cambiándolo cada 24 h. Pasadas las 48 h, se eliminó el fijador y las muestras se lavaron tres veces durante 15 min en tampón cacodilato 0.1 M pH 7. Se aplicó una fijación posterior con tetróxido de osmio al 1% en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente. El tetróxido de osmio se eliminó lavando las



muestras tres veces en agua destilada durante 15 min. A continuación, se procedió a su deshidratación a temperatura ambiente en un gradiente creciente de etanol: 50, 70, 90 y 100%, éste último tres veces, manteniendo las muestras 15 min en cada solución. Las muestras deshidratadas se sometieron a un proceso de desecación por punto crítico con dióxido de carbono en un desecador Polaron CPD 1501. Por último, se procedió al recubrimiento de las muestras en una unidad de evaporación con carbón HITACHI. Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-510 del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### 3.2.8. Microscopía electrónica de transmisión

Se fijaron cubos de exocarpo de 2 mm de lado en una mezcla de glutaraldehído al 2,5% (p/v) y paraformaldehído al 2% (p/v) en tampón cacodilato 0.05 M pH 7.4 durante 24 h a 4°C. Después se lavaron tres veces en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 durante 10 min a 4°C. Tras ello, se postfijaron 1 h a 4°C con tetróxido de osmio al 1% (p/v), conteniendo ferricianuro potásico también al 1% (p/v). Las muestras se lavaron tres veces durante 5 min con agua a 4°C. Después de lavar, se realizó una tinción en bloque con acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 2 h en agitación y oscuridad. A continuación, se hicieron 3 lavados de 5 min a temperatura ambiente. Después se procedió a su deshidratación a temperatura ambiente en un gradiente creciente de etanol: 50, 70, 90 y 100%, éste último tres veces, manteniendo las muestras 20 min en cada solución. La inclusión del material se realizó en la resina Epoxi Embed 812, pasando las muestras por las siguientes soluciones:

- Etanol 100% : resina (2:1) 1 h
- Etanol 100% : resina (1:1) 1 h
- Etanol 100% : resina (1:2) 1 h
- Resina pura 16 h a 4°C

Las muestras se montaron en los moldes de inclusión y se polimerizaron en resina pura durante 48 h a 60°C. Una vez obtenidos los bloques de inclusión, se procedió a la realización de cortes semifinos de 1 µm, para el estudio a microscopía óptica, y cortes ultrafinos de 50-70 nm de espesor mediante cuchilla de diamante Diatome. Los cortes se realizaron con un Ultramicrotomo Ultracut R de Reichert Jung del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.



Los cortes semifinos se tiñieron con azul de toluidina al 1% en bórax al 1% (p/v) en placa caliente. Los cortes ultrafinos se montaron sobre rejillas de cobre de 300 mesh y se contrastaron con acetato de uranilo al 1% (p/v) en etanol al 50% (v/v) durante 1 min y, posteriormente, se tiñieron con citrato de plomo según Reynolds (1963) en una atmósfera exenta de CO<sub>2</sub> durante 5 min.

La visualización y obtención de imágenes de microscopía óptica se realizaron según se indica en la Página 40. Las preparaciones de microscopía electrónica de transmisión se analizaron con el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución STEM PHILIPS CM20 del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### 3.3. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

#### 3.3.1. Modificadoras de la pared celular

##### a) Poligalacturonasa (PG; EC 3.2.2.15)

La extracción se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Chisari y cols. (2009) con modificaciones. El material vegetal, macerado en N<sub>2</sub> líquido, fue homogeneizado en proporción 1:1 (p/v) en tampón citrato sódico 0.1 M pH 7 que contenía NaCl 1 M y DL-ditioneitol (DTT) 1 mM. El homogenizado se centrifugó a 4°C y 4,000 x g durante 20 min. Para el análisis de la actividad se empleó el método adaptado por Wang y cols. (1997). Cada reacción consistió en 1 mL formado por 0.2 mL de extracto enzimático y ácido poligalacturónico al 0.5% (p/v) preparado en tampón acetato sódico pH 5. La mezcla se incubó a 35°C durante 4 h, tras ello, la reacción se paró adicionando 1 volumen de reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico 44 mM, sulfito sódico 4 mM y NaOH 375 mM) e hirviendo 10 min. Se añadió 1 volumen de agua a la mezcla de reacción y se enfrió a temperatura ambiente antes de medir su absorbancia a 575 nm. La actividad se calculó mediante una curva patrón de ácido D-(+)-galacturónico y se expresó en  $\mu\text{mol D-(+)-galacturónico h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ .

##### b) Pectin metilesterasa (PME; EC 3.1.1.11)

Tanto la extracción como el ensayo de la actividad se realizaron por el método descrito por Vicente y cols. (2005). El material vegetal macerado se homogeneizó en proporción en NaCl 1 M con PVPP (poli-vinilpolipirrolidona)





al 1%. Para el exocarpo se utilizó la proporción 1:3 (p/v) y para el mesocarpo y endocarpo 1:2 (p/v). El homogenado resultante se agitó a 4°C durante 4 h a una velocidad de 350 rpm y se centrifugó en frío a 20,000 x g durante 30 min. La reacción estaba compuesta por pectina cítrica al 0.3% (p/v), azul de bromotimol al 0.015% (p/v) y 0.15 mL de extracto enzimático para 1 mL. Todos los componentes de la misma se ajustaron a pH 7.5 con NaOH 1M. La reacción se inició con la adición del extracto y la disminución de la absorbancia fue medida a 620 nm durante 2 min. La generación de H<sup>+</sup> por la acción de la enzima se cuantificó con una curva patrón de D-(+)-galacturónico y se expresó en  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ .

### 3.3.2. Catabolismo de lípidos

#### a) Fosfolipasa C y D (PLC; EC 3.1.4.3 y PLD; EC 3.1.4.4)

La extracción de ambas fosfolipasas se realizó por el método descrito por Mao y cols. (2004). El exocarpo macerado fue homogenizado en proporción 1:2 (p/v) en tampón Tris-HCl 0.05 M pH 8 que contenía KCl 10 mM, sacarosa 0.5 M y PMSF 0.5 mM. El sobrenadante obtenido tras centrifugar 30 min a 15,000 x g y 4°C fue utilizado como extracto enzimático.

La actividad PLC se determinó mediante la técnica propuesta por Kurioka y Matsuda (1976). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL que contenía tampón Tris-HCl 0.25 M pH 7.2, D-sorbitol al 60% (p/v), D-nitrofenilfosforilcolina 20 mM y 0.05 mL de extracto. Para la PLD se utilizó el método descrito por Gupta y Wold (1980). La mezcla de reacción consistió en tampón acetato sódico 0.05 M pH 5.6, D-nitrofenilfosforilcolina 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.4 U de fosfatasa ácida comercial y 0.05 mL de extracto enzimático. Ambas reacciones se incubaron a 37°C durante 1 h y se pararon adicionando NaOH 4.5 mM. La lectura de las absorbancias se realizó a 400 nm. Las actividades se cuantificaron mediante una curva patrón de 4-nitrofenol y se expresaron en  $\mu\text{mol 4-nitrofenol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ .

#### b) Lipoxigenasa (LOX; EC 1.13.11.12)

La preparación de los extractos se realizó homogeneizando el material macerado en proporción 1:3 (p/v) en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6 que contenía NaCl 1 M. El homogenado se centrifugó 10 min a 12,000 x g y 4°C, y el sobrenadante fue empleado como extracto enzimático tras ser diluido 1:3



(v/v) con tampón de extracción sin NaCl. La actividad fue determinada según Axelrod y cols. (1981). La reacción se llevó a cabo en 1 mL y contenía tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6, ácido linoleico 2 mM y 0.05 mL de extracto. La lectura se realizó a una longitud de onda de 234 nm durante 1 min. La actividad fue calculada utilizando un coeficiente de extinción molar para el ácido linoleico de  $25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y se expresó en  $\mu\text{mol}$  de ácido linoleico  $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  PF.

### 3.3.3. Metabolismo oxidativo

#### a) Extracción

El material vegetal macerado se homogeneizó en proporción 1:3 (p/v) en tampón fosfato potásico 0.05 M pH 7.8 que contenía EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y PVPP al 10% (p/v). El homogenado se centrifugó en frío a  $15,000 \times g$  durante 15 min y el sobrenadante se empleó para la determinación de las actividades superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa total, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, monodeshidroascorbato y deshidroascorbato reductasa.

#### b) Superóxido dismutasa (SOD; EC; 1.15.1.1)

La actividad SOD se cuantificó mediante el método descrito por Beyer y Fridovich (1987) con algunas modificaciones. Se prepararon tres mezclas de reacción de 1 mL cada una. La primera correspondía al control y contenía tampón fosfato potásico 0.05 M pH 7.8, EDTA 0.1 mM, metionina 13 mM, riboflavina  $2 \mu\text{M}$  y NBT  $75 \mu\text{M}$ . La segunda y tercera correspondían a los blancos y las muestras e incluían, además de lo anterior, 0.1 mL de extracto enzimático diluido 1:3 (v/v). Las reacciones se mantuvieron en oscuridad y se midió su absorbancia a tiempo 0 a una longitud de onda de 560 nm. Las mezclas de reacción correspondientes a los blancos se mantuvieron en oscuridad, mientras que los controles y las muestras fueron iluminados con tubos fluorescentes durante 20 min con una intensidad lumínica media de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, se volvieron a medir a 560 nm. La actividad se expresó como  $\text{U min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  PF siendo una unidad la cantidad de enzima que produce una reducción de la absorbancia del 50%.

Para la tinción específica de la actividad SOD de geles nativos de poliacrilamida, se siguió la modificación del método de Beauchamp y Fridovich



(1971) realizada por Lee y Lee (2000). Después de la electroforesis, los geles se incubaron con azul de tetrazolio (NBT) 2.45 mM preparado en tampón fosfato potásico 0.05 M pH 7.8 durante 20 min. A continuación, los geles se incubaron 15 min en oscuridad con riboflavina 20  $\mu$ M y TEMED 28 mM preparados en el mismo tampón. Tras la incubación, los geles fueron expuestos a la luz en tampón fosfato potásico 0.05 M pH 7.8 hasta detectar las bandas. La identificación de las distintas isoformas de la SOD, se hizo incubando con los inhibidores específicos  $\text{CN}^-$  3 mM o  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 mM en tampón fosfato potásico 0.05 M pH 7.8 antes de la incubación con el NBT.

**c) Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)**

La actividad catalasa se determinó según Arbona y cols. (2008) cuantificando el consumo del  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 5 min a 25°C. La mezcla de reacción consistió en 1 mL formado por tampón fosfato potásico 0.05 M pH 7,  $\text{H}_2\text{O}_2$  3 mM y 0.1 mL de extracto. La determinación de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se realizó según se especifica en la Página 50.

**d) Peroxidasa total (POD; EC 1.11.1.7)**

La actividad POD total se midió según Chance y Maehly (1955). La reacción se realizó en un 1 mL y consistió en tampón fosfato sódico 0.05 M pH 7, guayacol 10 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  40 mM y 0.05 mL de extracto diluido de forma conveniente. El aumento de absorbancia de registro durante 2 min a 470 nm. La actividad se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del guayacol, 26,6  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  y se expresó en  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ .

**e) Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.1)**

En este caso, el tampón de extracción se suplementó con L-ascorbato sódico 5 mM para evitar la inactivación de la enzima. La actividad se analizó mediante el procedimiento descrito por Hossain y Asada (1984) con algunas modificaciones. La reacción estaba formada por tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.8, L-ascorbato sódico 0.4 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.3 mM y 0.05 mL de extracto diluido 1:5 (v/v) en un volumen final de 1 mL. La disminución de absorbancia se midió a 290 nm durante 1 min. La actividad se calculó utilizando para el ascorbato un coeficiente de extinción molar de 2,8  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  y se expresó en  $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ .



La tinción de geles nativos de poliacrilamida específica para la actividad APX se realizó siguiendo el método descrito por Mittler y Zilinskas (1993). En este caso, el tampón de electroforesis se suplementó con ascorbato sódico 2 mM y los geles se precorrieron 30 min antes de cargar las muestras. Después de la electroforesis, los geles se equilibraron durante 30 min con tampón fosfato sódico 0.05 M pH 7 que contenía ascorbato sódico 2 mM. A continuación, se incubaron con ascorbato sódico 4 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM en el mismo tampón. Para detectar las bandas, los geles se sumergieron en una solución de NBT 2.45 mM y TEMED 28 mM en el mismo tampón durante 10 min.

**f) Glutación reductasa (GR; EC 1.8.5.1)**

La actividad se cuantificó según Edwards y cols. (1990). La reacción contenía tampón Hepes-NaOH 0.01 M pH 7.8, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, glutatión oxidado 0.25 mM, NADPH 0.2 mM y 0.1 mL de extracto enzimático para 1 mL. La disminución de la absorbancia se midió a 340 nm durante 1 min. Para el cálculo de la actividad se empleó 6.22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> como coeficiente de extinción molar del NADPH y ésta se expresó en μmol NADPH min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PF.

**g) Monodeshidroascorbato y deshidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4 y DHAR; EC 1.8.5.1)**

La actividad MDHAR se midió por la técnica descrita por Hossain y cols. (1984). La reacción se llevó a cabo en 1 mL y contenía tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.8, NADH 0.2 mM, L-ascorbato sódico 1 mM, 0.5 U de ascorbato oxidasa comercial y 0.1 mL de extracto enzimático. La disminución de la absorbancia se midió a 340 nm durante 1 min. La actividad se calculó con un coeficiente de extinción molar de 6.22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para el NADH y se expresó en μmol NADH min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PF.

Para el análisis de la actividad DHAR se siguió el método empleado por Shigeoka y cols. (1980). La mezcla de reacción consistió en tampón fosfato potásico 0.05 M pH 6.5, deshidroascorbato sódico 2.5 mM, glutatión reducido 2.5 mM, NADPH 0.2 mM, 1 U de glutatión reductasa comercial y 0.1 mL de extracto enzimático en un volumen final de 1 mL.



### 3.3.4. Metabolismo fenólico

#### a) Fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC 4.3.1.5)

La extracción y la determinación de la actividad fueron realizadas mediante el método descrito por Civello y cols. (1997) con modificaciones. El material vegetal fue homogeneizado en proporción 1:2 (p/v) en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 8.8 que contenía EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, Tritón X-100 al 0.1% (v/v) y PVPP al 5% (p/v). Los extractos se agitaron a 300 rpm y 4°C durante 1 h, tras lo que fueron centrifugados 15 min a 12,000 x g y 4°C. La mezcla de reacción, de volumen final 1 mL, estaba constituida por tampón Tris-HCl 0.05 M pH 8.8, fenilalanina 10 mM y 0.1 mL de extracto enzimático. Después de una incubación a 37°C durante 1 h, la reacción se paró adicionando TCA hasta una concentración final del 20% e incubación en hielo 10 min. Las mezclas de reacción se centrifugaron a 13,000 x g 15 min antes de medir su absorbancia a 290 nm. La actividad se calculó mediante una curva patrón de ácido cinámico y se expresó en nmol ácido cinámico h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PF.

#### b) Polifenol oxidasa (PPO; EC 1.14.18.1)

La extracción se realizó homogeneizando el material en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.5 en proporción 1:2 (p/v). Los extractos se centrifugaron en frío a 20,000 x g durante 20 min. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron saturando con sulfato amónico y centrifugando 15 min a 15,000 x g y 4°C. El precipitado se resuspendió en 3 mL de tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.5 y se dializó 16 h a 4°C en el mismo tampón. La reacción se llevó a cabo en 1 mL con tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6, pirocatecol 20 mM y 0.1 mL de extracto enzimático. El aumento de absorbancia se registró durante 1 min a 470 nm. La actividad se expresó como  $\Delta DO_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PF}$ .

La tinción específica para la actividad PPO en geles nativos de poli(acrilamida) se hizo siguiendo el método descrito por Raimbault y cols. (2010) con algunas modificaciones. Después de la electroforesis, los geles se incubaron con tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6 que contenía pirocatecol 40 mM, CuCl<sub>2</sub> 2 mM y 100,000 U L<sup>-1</sup> de catalasa (Ortega-García y Peragón, 2010) comercial hasta que se detectaron las bandas.



### **3.3.5. Catabolismo de poliaminas: diamino y poliamino oxidasa (PAL; EC 4.3.1.5)**

La extracción se realizó siguiendo el procedimiento descrito para la PPO suplementando el tampón de extracción con NaCl 1 M. Las actividades DAO y PAO se determinaron según Su y cols. (2005) y Xu y cols. (2011) respectivamente. La reacción se llevó a cabo en 1 mL que contenía tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.5, 4-aminoantipirina al 0.008% (p/v), N,N-dimetilanilina al 0.006% (v/v), 5 U de peroxidasa de rábano comercial, 0.25 mL de extracto, putrescina 3 mM (DAO), espermidina y espermina 3 mM (PAO). La mezcla se incubó a 40°C durante 2 h y la reacción se paró centrifugando 5 min a 12,000 x g. Un incremento de la absorbancia a 555 nm de 0.01 se consideró una unidad de enzima. Ambas actividades enzimáticas se expresaron en  $U\ h^{-1}\ g^{-1}\ PF$ .

### **3.3.6. Extracción de proteínas para inmunotransferencia**

Para la extracción de proteínas, el material se homogeneizó en tampón Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 que contenía EDTA 1 mM y PMSF 1 mM en proporción 1:3 (p/v). El homogenizado resultante se centrifugó a 10,000 x g y 4°C durante 30 min. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron durante toda la noche a -20°C mediante la adición de acetato de amonio 0.1 M preparado en metanol en proporción 1:5 (v/v). Tras centrifugar 30 min a 4°C y 10,000 x g, el pellet fue lavado dos veces con acetato de amonio 0.1 M en metanol y una vez en acetona al 80% (v/v). Finalmente, el pellet fue secado a temperatura ambiente y resuspendido directamente en tampón de carga Tris-HCl 0.025 M pH 6.8, SDS al 1% (p/v), glicerol al 10% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% (v/v) y azul de bromofenol al 0.002% (p/v).

### **3.3.7. Concentración de proteínas**

La cuantificación de proteínas se realizó de acuerdo al método descrito por Lowry y cols. (1951), usando albúmina de suero bovino como estándar.

### **3.3.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida**

#### **a) Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

Para la separación de proteínas mediante SDS-PAGE se siguieron las condiciones descritas por Laemmli (1970). La composición de los geles de 0.75



mm de grosor, se especifica en la Tabla 3.1. Se cargaron 60-80  $\mu\text{g}$  de proteína resuspendida en tampón de carga (Punto 3.3.6) y hervida 2 min antes de la electroforesis. Ésta se realizó en un sistema Mini Protean II (BioRad) durante 1-1.5 h a 130 V en tampón Tris-HCl 0.025 M pH 8.3 que contenía glicina 1.92 M y SDS al 1% (p/v). La tinción de los geles se hizo con azul Coomassie al 0.2% (p/v) en una solución de ácido acético:metanol:agua (10:45:45; v/v/v).

**Tabla 3.3.1.** Composición los geles de poliacrilamida

	Gel concentrador	Gel separador
Bis-acrilamida 30%	6%	12%
Tampón Tris-HCl pH 6.8	0.125 M	0
Tampón Tris-HCl pH 8.5	0	0.25 M
SDS 10%	0.1%	0.1%
Persulfato amónico 10%	70	30
TEMED	0.1%	0.05%

#### b) Geles de poliacrilamida en condiciones nativas

Los geles de poliacrilamida en condiciones nativas se prepararon de la misma forma que los desnaturalizantes pero sin añadir SDS al gel ni al tampón de electroforesis. Las muestras no se hirvieron antes de la electroforesis y al tampón de carga no se le añadió  $\beta$ -mercaptoetanol.

#### 3.3.9. Transferencia e inmunodetección de proteínas

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond (4.5  $\mu\text{m}$ ) usando el sistema de transferencia húmeda Mini Protean II (BioRad). La transferencia se realizó durante 50 min a 100 V.

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se lavaron 15 min en solución de lavado compuesta por tampón TBS y Tween-20 al 0.05% (v/v). Posteriormente, se bloquearon durante 30 min con solución de bloqueo similar a la solución de lavado pero que contenía además un 2% de leche en polvo. Para la detección de proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP) se utilizó el anticuerpo (Ac) policlonal anti-HSPC1 obtenido por Polenta y cols. (2007) en dilución 1:750 (v/v) en solución de bloqueo. La detección de



proteínas de estrés de 60, 70 y 90 kDa (HSP60, HSP70, HSP90) se llevó a cabo con los Ac monoclonales comerciales anti-HSP60, anti-HSP70 y anti-HSP90 (Sigma) en dilución 1:1500 (v/v) en solución de bloqueo. La incubación de las membranas con los Ac primarios fue de 90 min. Después, las se lavaron 15 min con solución de lavado. Los anticuerpos secundarios empleados fueron anti-IG de ratón para el caso de anti-HSP60, 70 y 90, y anti-IG de conejo frente a anti-HSP21 ambos conjugados con fosfatasa alcalina (BioRad). Las membranas se incubaron con una dilución de estos anticuerpos 1:1500 (v/v) en solución de bloqueo durante 90 min. Tras lavar 3 veces con la solución de lavado, las membranas se revelaron usando con cloruro de azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato del kit (Bio-Rad) hasta visualizar las bandas.

### 3.3.10. Análisis de imágenes

Las imágenes de los geles y las membranas se obtuvieron con un equipo GS-800 Imaging Calibrated Densitometer y se analizaron con el programa Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad).

## 3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

### 3.4.1. Peroxidación lipídica

La determinación de la peroxidación lipídica se llevó a cabo mediante el método descrito por Heath y Packer (1968) basado en la cuantificación de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). El método se basa en la reacción del TBA con el grupo aldehído del malondialdehído (MDA), producto final de la peroxidación lipídica. El material vegetal se homogeneizó con TCA al 20% (p/v) y 0.4% (p/v) de hidroxitolueno butilado en proporción 1:4 (p/v). A continuación, el homogenado se centrifugó a 4°C y 10,000 x g durante 15 min. El sobrenadante se mezcló con TBA al 0.5% (p/v) en TCA al 20% (p/v) en proporción 1:4 (v/v). La mezcla fue calentada durante 30 min a 95°C y, posteriormente, enfriada en hielo. Tras centrifugar a 4°C y 4,000 x g 10 min, la absorbancia del sobrenadante se midió a 562 y 600 nm. Las TBARS se calcularon mediante una curva patrón de MDA y los resultados se expresaron en nmol g<sup>-1</sup> PF.





### 3.4.2. Peróxido de hidrógeno

El contenido en  $H_2O_2$  se determinó según Alexieva y cols. (2001). El material vegetal se homogeneizó en TCA al 0.1% (p/v) en proporción 1:4 (p/v). El homogenado fue centrifugado 15 min a 12,000 x g y 4°C. La reacción se llevó a cabo en 1 mL formado por 0.25 mL del sobrenadante obtenido, 0.25 mL de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7 y yoduro potásico 0.5 M. Después de 1 h de incubación en oscuridad, se midió la absorbancia a 390 nm. La cuantificación se realizó a partir de una curva patrón de  $H_2O_2$  y los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF.

### 3.4.3. Capacidad antioxidante y fenoles totales

#### a) Extracción

La preparación de los extractos se realizó homogeneizando el material macerado en acetona al 80% (v/v) en proporción 1:10 (p/v) para el exocarpo y 1:5 (p/v) para el mesocarpo y endocarpo. Los extractos se agitaron a 300 rpm y 4°C durante 30 min, y se centrifugaron 15 min a 4,000 x g y 4°C. El sobrenadante se empleó para la determinación de la capacidad antioxidante total y el contenido en fenoles.

#### b) Capacidad antioxidante total: DPPH y FRAP

La capacidad antioxidante se analizó mediante la técnica descrita por Sánchez-Moreno y cols. (2003) basada en el uso del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) y por el método FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) propuesto por Benzie y Strain (1996) basado en el empleo del radical  $Fe^{3+}$ -TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triacina). En el primer caso, a distintos volúmenes de extracto de volúmenes comprendidos entre 0.2 y 0.8 mL, se añadió 3.9 mL de reactivo DPPH al 0.003% preparado en metanol (p/v), incubando en oscuridad y temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se midió la absorbancia a 517 nm. El DPPH remanente de cada alícuota se calculó como porcentaje respecto a los blancos. Después se obtuvo el  $IC_{50}$  de cada muestra como el volumen de la misma necesario para reducir un 50% la cantidad inicial de DPPH. La capacidad antioxidante total se expresó como equivalentes de ácido ascórbico  $g^{-1}$  PF obtenidos mediante una curva patrón de este compuesto. Para la determinación de la capacidad antioxidante total mediante FRAP, el reactivo utilizado se preparó en tampón acetato sódico 0.3 M pH 3.6 con TPTZ



10 mM (disuelto en HCl 40 mM) y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM. La mezcla de reacción consistió en 0.9 mL de reactivo y 0.1 mL de extracto y se incubó durante 2 h a 37°C. La absorbancia se midió a 593 nm. La capacidad antioxidante total medida por este método se calculó mediante una curva patrón preparada con  $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y se expresó en  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1} \text{ PF}$ .

### c) Fenoles totales

A 0.5 mL de extracto se le añadió 0.25 mL de reactivo de Folin-Cicolteau diluido 1:5 (v/v). La mezcla se agitó y se dejó reaccionar 3 min, adicionándose después 0.5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% (p/v). Los volúmenes de reacción se ajustaron a 4 mL con agua destilada. Después de una incubación de 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó 5 min a 4,000 x g y se midió su absorbancia a 760 nm. El contenido en fenoles totales se calculó mediante una curva patrón realizada con ácido gálico y se expresó en  $\text{mg g}^{-1} \text{ PF}$ .

## 3.4.4. Pigmentos, prolina, aminoácidos libres y azúcares solubles totales

### a) Extracción

El tejido macerado se homogeneizó en proporción 1:5 (p/v) con la mezcla etanol:cloroformo:agua (12:5:1, v/v/v) y se centrifugó en frío a 3,500 x g 10 min. Al sobrenadante se añadió 1 volumen de la mezcla cloroformo:agua (1:0.25, v/v), se agitó y se dejó separar las fases durante 24 h a 4°C. La fase orgánica se utilizó para la determinación de pigmentos y la acuosa para la medida de la concentración de prolina, aminoácidos libres y azúcares solubles totales.

### b) Pigmentos

La determinación de pigmentos se realizó según Wellburn (1994). Se midió la absorbancia de la misma a 480, 648 y 666 nm y se emplearon las siguientes fórmulas para el cálculo de las concentraciones: Clorofila a ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) =  $10.91A_{666} - 1.2A_{648}$ ; Clorofila b ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) =  $16.38A_{648} - 4.57A_{666}$ ; Carotenos + xantofilas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) =  $(1000A_{480} - 1.42C_{la} - 46.09C_{lb})/202$ . Los datos se expresaron en  $\text{mg g}^{-1} \text{ PF}$ .



### **c) Prolina**

La cuantificación del contenido en prolina se realizó siguiendo el método descrito por Bates y cols. (1973). La reacción se llevó a cabo en 2.5 mL y contenía 0.25 mL de extracto diluido 1:1 (v/v), 0.75 mL de ácido acético glacial, 0.75 mL de reactivo de ninhidrina, compuesto por ninhidrina 2.5% (p/v) en ácido acético glacial:ácido ortofosfórico 3:2 (v/v), y 0.75 mL de agua. La mezcla se calentó a 100°C durante 1 h y la reacción se paró enfriando en hielo. A cada tubo, se añadió 1 mL de tolueno y se agitó, midiéndose la absorbancia de la fase orgánica a 515 nm. La concentración se calculó a partir de una curva patrón de prolina y se expresó como  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF.

### **d) Aminoácidos libres totales**

La reacción se llevó a cabo en 1 mL y consistió en 0.25 mL de extracto diluido 1:20 (v/v) y 0.75 mL de reactivo de ninhidrina, compuesto por ninhidrina 4% (p/v) disuelta en etilenglicol a la que se añade un volumen de tampón citrato 0.2 M pH5. La mezcla se calentó a 100°C 15 min, tras lo cual se paró la reacción enfriando en hielo. Se añadieron 2 volúmenes de etanol al 50% y se midió la absorbancia a 570 nm. La concentración de aminoácidos libres totales se calculó a partir de una curva patrón de leucina y se expresó como  $\text{mg g}^{-1}$  PF.

### **e) Azúcares solubles totales**

Para la cuantificación se empleó la técnica utilizada por Irigoyen y cols. (1992). La reacción se llevó a cabo en 1 mL y consistió en 0.25 mL de extracto diluido 1:10 (v/v) y 0.75 mL de reactivo de antrona, compuesto por antrona 4% (p/v) en ácido sulfúrico al 72%. La mezcla se calentó a 100°C durante 10 min. La reacción se paró a 4°C y la absorbancia de la muestra se midió a 625 nm. La concentración de azúcares solubles totales se calculó a partir de una curva patrón de glucosa y se expresó como  $\text{mg g}^{-1}$  PF.

### **3.4.5. ATP, ADP y AMP**

Los extractos se prepararon homogeneizando el exocarpo en proporción 1:2.4 (p/v) con ácido perclórico al 5% (v/v). Después de centrifugar a 6,000 x g y 4°C durante 10 min, el sobrenadante fue neutralizado a pH 6.5-6.8 incubando



30 min a 4°C con KOH. Tras centrifugar 5 min a 3,000 x g y 4°C, el sobrenadante se filtró con filtros de nylon de 0.22 µm.

El análisis se llevó a cabo en un HPLC Hewlett-Packard con una columna C18 de 4.6 x 150 mm. El volumen de inyección fue de 0.02 mL y la separación se llevó a cabo con un gradiente lineal especificado en la Tabla 3.4.1. La detección se realizó con un diodo de array a 260 nm. La concentración de ATP, AMP y ADP se calculó mediante una curva patrón de cada uno y se expresó como µg g<sup>-1</sup> PF. De acuerdo con Pradet y Raymond (1983), la carga energética se calculó mediante la fórmula:  $7 ([ATP] + 0.5 \times [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$ .

**Tabla 3.4.1.** Condiciones de elución para la separación cromatográfica del ATP, ADP y AMP.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
2	95	5
4	85	15
5	75	25
7	70	30
8	100	0

Flujo: 1.3 mL min<sup>-1</sup>

Solvente A: 60 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en agua Milli-Q pH 7  
Solvente B: acetonitrilo

### 3.4.6. Ascorbato total

La extracción se realizó según Alós y cols. (2013) con modificaciones. El material vegetal se homogeneizó en ácido metafosfórico al 5% (p/v) en proporción 1:2 (p/v). El homogenado se centrifugó a 13,500 x g y 4 °C durante 15 min. Se añadió DTT al sobrenadante hasta una concentración final de 5 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h en oscuridad. Después de filtrar a través de filtros de nylon de 0.22 µm, se realizó la separación cromatográfica.

El análisis se llevó a cabo en un HPLC Hewlett-Packard con una columna C18 de 4.6 x 250 mm. El volumen de inyección fue de 0.02 mL y la separación se llevó a cabo con un gradiente lineal especificado en la Tabla 3.4.2. La detección se realizó con un diodo de array a 254 nm. La concentración



de ascorbato se calculó mediante una curva patrón y se expresó como  $\text{nmol g}^{-1}$  PF.

**Tabla 3.4.2.** Condiciones de elución para la separación cromatográfica del ascorbato.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
8	100	0

Flujo:  $1.3 \text{ mL min}^{-1}$   
 Solvente A: 60 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 40 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en agua Milli-Q pH 7  
 Solvente B: acetonitrilo

### 3.4.7. Glutación

Tanto la extracción como la cuantificación del glutatión se realizó de acuerdo al método descrito por Airaki y cols. (2011). El material macerado en  $\text{N}_2$  líquido se homogeneizó en HCl 0.1 M en proporción 1:4 (p/v). Tras centrifugar a 21,000 x g durante 20 min y a 4°C, el sobrenadante se filtró a través de filtros de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Los análisis se realizaron con 30  $\mu\text{L}$  de muestra en un sistema HPLC Allience 2695 equipado con una columna Atlantis T3 (3x150mm, 3 $\mu\text{m}$ , Waters) siguiendo el gradiente de elución especificado en la Tabla 3.4.3. Los eluatos se detectaron usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quattro Micro (Waters). El voltaje de electrospray iónico fue de 3 kV y la temperatura de 350°C. Los distintos compuestos se detectaron en modo de monitorización de reacción múltiple con las siguientes transiciones: GSH,  $m/z$  307.76 $\rightarrow$ 178.81 y GSSG,  $m/z$  612.9 $\rightarrow$ 351.61. La concentración de GSH y GSSG se calculó con una curva patrón de los mismos y se expresó como  $\text{mg g}^{-1}$  PF.

**Tabla 3.4.3.** Condiciones de elución para la separación cromatográfica del glutatión.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	5	95
14	5	95

Flujo:  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$   
 Solvente A: acetonitrilo  
 Solvente B: Agua Milli-Q con 0.1% de ácido trifluoroacético



### 3.4.8. Ácidos grasos

La extracción de los lípidos totales de las muestras se llevó a cabo según Valero-Garrido y cols. (1990) con algunas modificaciones. El material vegetal se homogeneizó en proporción 1:12 (p/v) en el caso del exocarpo y 1:3 (p/v) en el del mesocarpo y endocarpo con la mezcla cloroformo:metanol:HCl 0.1M (200:100:1, v/v/v). Tras 2h de agitación a 4°C y 300 rpm, se adicionó al homogenado un volumen de HCl 0.1M y se centrifugó durante 10 min a 4,000 x g y 4°C. Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se re-extrajo con 1 mL de cloroformo. Ambas fases orgánicas fueron combinadas y evaporadas bajo corriente continua de N<sub>2</sub>. El residuo seco resultante fue disuelto en 0.5 mL de cloroformo. A 10 µL de esta solución, se le adicionaron 50 µL de benceno y 40 µL de reactivo de transesterificación Meth-Prep II (Alltech Associates, Inc., Deefield, IL, USA). La mezcla se incubó a temperatura ambiente 30 min y, a continuación, 1 µL se inyectó en el cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Agilent, USA) acoplado a un espectrómetro de masas Quattro micro GC (Waters, UK). La separación se hizo con helio a un flujo de 1 mL/min y una temperatura inicial de 140°C, pasando a 250°C desde los 4 a los 12.5 min. La detección con el espectrómetro de masas se realizó a una temperatura de 250°C, con modo de ionización EI+, energía de 70 eV y un rango de masas de 45-450 Da. Los tiempos de retención se compararon con los compuestos estándar y los resultados se expresaron en mg g<sup>-1</sup> PF.

### 3.4.9. Poliaminas

Para la extracción y cuantificación del contenido en poliaminas se adaptó el método empleado por Flores y Galston (1982) con modificaciones. Al material macerado se le añadió 1,7-diaminoheptano como estándar interno y se homogeneizó con ácido perclórico 5% (v/v) en proporción 1:3 (p/v). Después de 24 h de incubación a 4°C, el homogenado se centrifugó 5 min a 3,000 x g y 4°C. A 1 volumen de sobrenadante se añadieron 2 volúmenes de cloruro de dansilo al 1% (p/v), preparado fresco en acetona, y 1 volumen de carbonato sódico saturado. La mezcla fue incubada en oscuridad toda la noche. El exceso de cloruro de dansilo se eliminó añadiendo ½ volumen de prolina al 10% (p/v) e incubando 30 min a temperatura ambiente. Las poliaminas dansiladas se extrajeron en 2 volúmenes de tolueno. La fase orgánica se secó y disolvió en 0.1 mL de acetonitrilo antes del análisis.



Las poliaminas se analizaron por HPLC utilizando un sistema Hewlett-Packard equipado con una columna C18 de 4.6 x 250 mm en las condiciones especificadas en la Tabla 3. El volumen de inyección fue de 0.01 mL y la detección se realizó con un fluorómetro con unas longitudes de onda de excitación y emisión de 415 y 510 nm respectivamente. La concentración de putrescina, espermidina y espermina calculó con una curva patrón de las mismas y se expresó como  $\text{nmol g}^{-1}$  PF.

**Tabla 3.4.3.** Condiciones de elución para la separación de las poliaminas

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	30	70
4.5	30	70
9	0	100
14	0	100
15	30	70

Flujo:  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$   
Solvente A: agua Milli-Q  
Solvente B: acetonitrilo

#### 3.4.10. Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC)

La extracción se realizó según con algunas modificaciones. El material se homogeneizó en etanol al 80% (v/v) en proporción 1:10 (p/v). Los extractos se calentaron a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 15 min y se centrifugaron 30 min a  $3,500 \times g$  y  $4^{\circ}\text{C}$ . El pellet se volvió a extraer de la misma forma. Ambos sobrenadantes se combinaron y secaron. El residuo seco se resuspendió en 0.9 mL de agua y se añadió el mismo volumen de cloroformo. Tras la separación de las fases, se tomó la acuosa para realizar la determinación. El contenido en ACC se cuantificó como producción de etileno por el método de . A 0.4 mL de la fase acuosa se añadieron 0.1 mL de  $\text{HgCl}_2$  0.01 M en viales de 12 mL que fueron sellados. A cada vial se inyectó un volumen de 0.1 mL de la mezcla  $\text{NaOCl}$  5%: $\text{NaOH}$  saturado (2:1, v/v). Después de incubar 2.5 min en hielo, se inyectaron 0.5 mL de muestra gaseosa del vial en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 8600. El contenido en ACC se expresó como  $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}$  producido por  $\text{g}^{-1}$  PF.



### 3.4.11. Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA), ácido glutámico y betaína

Los extractos se prepararon homogeneizando el exocarpo en proporción 1:10 (p/v) en la mezcla etanol:cloroformo:agua (12:5:1, v/v/v) y se centrifugó en frío a 8,000 x g 10 min. A continuación, se añadió al sobrenadante 1 volumen de la mezcla cloroformo:HCl 0.1 M:agua (1:1:0.5, v/v/v) y se incubó 24 h a 4°C. La fase acuosa se evaporó bajo corriente de N<sub>2</sub>. El residuo seco se disolvió en 0.3 mL de metanol y 1.2 mL de acetonitrilo y se filtró a través de filtros de nylon de 0.22  $\mu$ m.

El análisis se realizó en un sistema UPLC Acquity equipado con una columna Acquity UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m, 2.1 X 50mm, siguiendo el gradiente de elución especificado en la Tabla 3.3.1. Los eluatos se detectaron usando un espectómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-S (UPCL/ESI-MS/MS, Waters) en modo de ionización positiva (ESI). El voltaje de electrospray iónico fue de 2,5 kV y la temperatura de 400°C. Los distintos compuestos se detectaron en modo de monitorización de reacción múltiple con las siguientes transiciones: betaína, m/z 118.24→58.86; GABA, m/z 103.97→68.80 y 103.97→86.71 y ácido glutámico, m/z 147.96→83.85 y 147.96→129.90. La concentración de GABA, ácido glutámico y betaína calculó con una curva patrón y se expresó como nmol g<sup>-1</sup> PF.

**Tabla 3.4.5.** Condiciones de elución para la separación de la betaína, el GABA y el ácido glutámico.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	25	75
2	25	75

Flujo: 0.4 mL min<sup>-1</sup>

Solvente A: agua Milli-Q con 0.01% de ácido fórmico y 0.05% de amonio

Solvente B: acetonitrilo

### 3.4.12. Ácidos salicílico, jasmónico, abscísico e indolacético

Para la extracción, el tejido pulverizado en N<sub>2</sub> líquido se homogeneizó en proporción 1:8 (p/v) en metanol frío que contenía BHT al 2% (p/v). El homogenado fue ultrasonificado durante 25 min a 4°C y, después, agitado 2 h a 300 rpm y 4°C. Tras centrifugar a 3,000 x g y 4°C durante 10 min, el





sobrenadante fue colectado y las hormonas del pellet volvieron a extraerse con un 1 mL de metanol. Los sobrenadantes se combinaron y secaron con N<sub>2</sub>. El residuo seco se disolvió en 2 mL de agua. El pH se ajustó a 1.5-2.5 con HCl 1 M. Las hormonas se extrajeron dos veces en 1.5 mL de acetato de etilo, eliminándose los restos de agua de la fase orgánica mediante adición de sulfato sódico anhidro. La fase orgánica secada con N<sub>2</sub> se resuspendió en metanol y filtró en filtros de nylon de 0.22 µm.

El análisis se realizó en un sistema UPLC Acquity equipado con una columna Acquity UPLC HSS T3 1.8 µm, 2.1 X 100mm, siguiendo el gradiente de elución especificado en la Tabla 3.3.1. Los eluatos se detectaron usando un espectómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-S (UPCL/ESI-MS/MS, Waters) en modo de ionización electrospray negativa (ESI). El voltaje de spray iónico fue de -2 kV y una temperatura de 150°C. Las distintas fitohormonas se detectaron en modo de monitorización de reacción múltiple con las siguientes transiciones: ácido abscísico, m/z 263.04→153.08 y 263.04→219.12; ácido indolacético, m/z 175.97→103.09 y 175.97→130.07; ácido salicílico, m/z 136.81→75.03 y 136.81→92.98; ácido jasmónico, m/z 209.03→59.04 y 209.03→109.09. La concentración de ácido salicílico, jasmónico, abscísico e indolacético calculó con una curva patrón de los mismos y se expresó como µmol g<sup>-1</sup> PF.

**Tabla 3.4.6.** Condiciones de elución para la separación de los ácidos abscísico, indolacético, jasmónico y salicílico.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	95	5
6	0	100
6.10	95	5
8	95	5

Flujo: 0.6 mL min<sup>-1</sup>

Solvente A: agua Milli-Q pH 7 con 0.01% de ácido fórmico.

Solvente B: acetonitrilo con 0.01% de ácido fórmico.



## **3.5. ANÁLISIS MOLECULARES**

### **3.5.1. Extracción del ARN total**

El ARN total de las muestras se extrajo siguiendo el método descrito por Verwoerd y cols. (1989). Al material vegetal pulverizado en N<sub>2</sub> líquido se añadió la mezcla fenol:tampón de extracción 1:1 (v/v) precalentada a 60°C en proporción 1:4 (p/v). El tampón de extracción estaba compuesto por Tris 0.1 M pH 8, LiCl 0.1 M, EDTA 10 mM y SDS al 1% (p/v). La mezcla se homogeneizó por agitación, se enfrió y centrifugó a 4°C y 4,000 x g durante 10 min. La fase acuosa se recuperó y se le añadió 1 volumen de cloroformo. La mezcla se agitó y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se recuperó la fase acuosa y se añadió 1/3 de volumen de LiCl 8 M. El ARN se precipitó a 4°C durante toda la noche, tras lo cual, se centrifugó a 4°C y 4,000 x g durante 10 min. El ARN precipitado se lavó con etanol 70% a -20°C. Tras eliminar los restos de etanol, el ARN se dejó secar y se resuspendió en H<sub>2</sub>O tratada con DMPC.

La integridad del ARN fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE teñidos con GoldView<sup>TM</sup> (Viswagen Biotech Pvt. Ltd.). La cuantificación del mismo se realizó en un NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

### **3.5.2. Tratamiento con ADNasa**

El ARN total extraído de las muestras fue tratado con ADNasa para eliminar los restos de ADN genómico. El tratamiento se realizó en columna de limpieza RNasy<sup>®</sup> MiniElute<sup>®</sup> Cleanup (Qiagen) con la enzima RNase-Free DNase (Qiagen).

### **3.5.3. Síntesis de ADNc**

La síntesis del ADNc se llevó a cabo a partir de 1 µg de ARN total tratado con ADNasa utilizando la enzima Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **3.5.4. RT-PCR**

Las reacciones de RT-PCR se realizaron con la enzima MBL-Taq DNA Polimerasa (Dominion MBL) en un termociclador XP Thermal Cycler (Bioer



Technology CO., LTD). Los cebadores empleados en este trabajo se especifican en la Tabla 3.7. Las secuencias *CpACO1*, *CpADC1*, *CpAPX1*, *CpODC1*, *CpPAL1* y *CpPLD1* han sido obtenidas en nuestro laboratorio mientras que *AOX*, *CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *EF-1 $\alpha$* , *CpFAD2*, *G6PDH*, *NAD-EM*, *NADP-EM* y *UFP* se obtuvieron por distintos autores (Esaka y cols., 1997; Havelda y Maule, 2000; Obrero y cols., 2011; Megías y cols., 2014) y han sido tomadas de las bases de datos. Los cebadores empleados en las reacciones de RT-PCR, RT-PCR semicuantitativa y RT-PCR cuantitativa se recogen en la Tabla 3.5.1.

**Tabla 3.5.1.** Genes analizados y cebadores utilizados en este trabajo.

Gen	Nº Acceso	Cebador	Secuencia (5'→3')	Uso
<i>CpACO1</i> (ACC oxidasa 1)		ACCoF	GGGATTCTTTGAGCTGGTGA	RT-PCR semicuantitativa
		ACCoR	GGGAGATGACGCAAGAGAA	
<i>CpADC1</i> (Arginina descarboxilasa 1)	KF880789	ADCrtF	ACTCCTGGCAATGAGCTGTT	RT-PCR cuantitativa
		ADCrtR	ATCACAGGGCGAACAAAGAG	
<i>AOX</i> (Oxidasa alternativa)	EF103124	CpAOXrtF	GAAGCAGAGAACGAGAGGAT	RT-PCR semicuantitativa
		CpAOXrtR	GGGGGACATCAAGTAGAGCA	
<i>CpAPX1</i> (Ascorbato peroxidasa 1)	KF954415	PerCs1	ATGGCAAAGTGCTACCCTGTTGTGAG	RT-PCR
		PerCs2	TCAAGCATCAGCAAAACCTAGCTCGG	
		APXrtF	GCCTTGACATTGCTGTTA	RT-PCR semi y cuantitativa
		APXrtR	GAACCCTTGGTAGCATCA	
<i>CAT1</i> (Catalasa 1)	D55645	Cat1RTF	ATATGGTTCTTCCCCGTTCC	RT-PCR semi y cuantitativa
		Cat1RTR	TCCTCTAGCATGGACACCCC	
<i>CAT2</i> (Catalasa 2)	D55646	Cat2RTF	CGCAAGAAGATCGTGTTC AA	RT-PCR semi y cuantitativa
		Cat2RTR	CTTAGGAAGCAACAAAGGCG	
<i>CAT3</i> (Catalasa 3)	D55647	Cat3RTF	AGGAAGCAAGCCCAACACTA	RT-PCR semi y cuantitativa
		Cat3RTR	ACGAAACGAATCCAAAGCTG	
<i>EF-1<math>\alpha</math></i> (Factor de elongación 1 $\alpha$ )	HO702383	EF-1AZ1f	GCTTGGGTGCTCGACAAACT	RT-PCR cuantitativa
		EF-1AZ1r	TCCACAGAGCAATGTCAATGG	
<i>CpFAD2</i> ( $\omega$ -6 desaturasa)	AY525163	W6FAdf	TTCTGTCTCCGCTCATTCT	RT-PCR cuantitativa
		W6FAdr	GACCCATACGCCAGTAAGGA	
<i>G6PDH</i> (Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)	AF260736	CpG6PrtF	TCCTGAAGTCCATGAGACCC	RT-PCR semicuantitativa
		CpG6PrtR	TCGGAGTGATGCTATCGTTG	



<i>NAD-EM</i> (Enzima málico dependiente de NAD)	AF260735	CpME1rtF	AGACGAGCAACTGGAGAGGA	RT-PCR semicuantitativa
		CpME1rtR	GTACCGCCAATGAGTTTGAG	
<i>NADP-EM</i> (Enzima málico dependiente de NADP)	AF260732	CpME2rtF	TGTGATTGTTGTTACCGACG	RT-PCR semicuantitativa
		CpME2rtR	TCAATCATGACTGGAAGCAC	
<i>CpODC1</i> (Ornitina descarboxilasa 1)	KF880790	CODCrF	TCATATTGGAAGTGGGGATG	RT-PCR cuantitativa
		CODCrR1	TTCATAGCGGAAGGGCAAG	
<i>CpPALI</i> (Fenilalanina amonio-liasa 1)	-	CsPAL1F	AARGCTAGYAGYGATTGGGTBATG	RT-PCR
		CsPAL4F	ACRTCTTGRTRTGTGTYTCGGC	
		CsPAL2F	AARGGNACYGATTCKTAYGGWGT	RT-PCR
		CsPAL3F	GTTCTTGRAAGTTRCCTCCTRTG	
		PALrtF	TCCATTTCAGAGCCCTGTTTC	
PALrtR	TCCAGAAGCCAAAGCAAGAT	RT-PCR semicuantitativa		
<i>CpPLDI</i> (Fosfolipasa D 1)	-	PLDforw	CAYCAYGATGAYTTYCAYCARCC	RT-PCR
		PLDrev	TAYTCRTRCRTCACDATCATCAT	
		CpFldf1	TTCCATAAACAAAGGCGGTCCG	RT-PCR
		CpFldf2	CGTCGTCAACAATCATCATCTTGCC	
		FosD1rtf	GATGTGAAGCCGGAGATGAT	
FosD1rtr	TCTTAACTTCGCGATTGCCT	RT-PCR semi y cuantitativa		
<i>UFP</i> (Proteína de fusión a ubiquitina)	CD726808	UFPZ1F	CGCACCAGCAGAGGCTTATC	RT-PCR semicuantitativa
		UFPZ1R	GAGAGTTTCGCCCATCCTCAA	

A=adenina; T=timina; G=guanidina; C=citosina; B= D=A, G o T; K=G o T; N=A, C, G o T; R=A o G; V=A, G o C; Y=C o T; W=A o T.

### 3.5.5. Preparación de bacterias competentes

Las bacterias *Escherichia coli* (cepas DH5 $\alpha$ ) competentes se prepararon por el método descrito por Hanahan (1983). Se cultivaron las bacterias durante toda la noche en 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) líquido, compuesto por triptona al 1% (p/v), extracto de levadura al 0.5% (p/v) y NaCl al 0.5% (p/v) a pH 7. Al día siguiente, se inocularon 100 mL de medio LB líquido suplementado con MgSO<sub>4</sub> 10 mM con 4 mL de cultivo bacteriano. Se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0.6-0.7 (fase logarítmica). Después, el crecimiento se detuvo enfriando en hielo durante 15 min. Las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación 10 min a 4,000 x g y 4°C. El precipitado se resuspendió suavemente en 32 mL de solución RF1 pH 5.8 estéril (Acetato potásico 30 mM, RbCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM y



glicerol al 12% (v/v)) y se incubó en hielo 15 min. Las células se precipitaron por centrifugación en las mismas condiciones. El precipitado fue resuspendido en 4 mL de solución RF2 pH 6.8 estéril (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM y glicerol al 12% (v/v)). La suspensión se repartió en alícuotas y se almacenó a -80°C.

### 3.5.6. Transformación

Los productos amplificados por RT-PCR se purificaron mediante los kits *MBL-PCR QuickClean* (Dominion MBL) y *GeneJET PCR Purification* (Thermo Scientific) o se aislaron de los geles de agarosa mediante los kits *MBL-Agarosa QuickClean* (Dominion MBL) y *GeneJET Gel Extraction* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Para la transformación de las bacterias competentes se utilizó el vector pMBL-T (Dominion MBL). Los fragmentos aislados se ligaron en el plásmido en proporción 3:1 (inserto:plásmido) con la enzima T4 ADN ligasa (Dominion MBL). Se añadió 5 µL de mezcla de ligación a una alícuota de bacterias competentes y se incubó en hielo durante 1 h. A continuación, se le aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 min, se le añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 37°C en agitación durante 1-2 h. Se sembraron 0.1-0.2 mL de cultivo bacteriano en placas con medio LB sólido suplementado con ampicilina al , IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactósido). Las placas se incubaron 24 h a 37°C, tras lo cual, se seleccionaron las colonias positivas.

### 3.5.7. Extracción de ADN plasmídico

El ADN de los plásmidos se extrajo con los kits para la Purificación Estándar de Plásmidos (Dominion MBL) y *GeneJET Plasmid Miniprep* (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

### 3.5.8. Secuenciación

El ADN plasmídico o los fragmentos amplificados por RT-PCR se secuenciaron en un secuenciador 3130 Genetic Analyzer de 4 capliares (Applied Biosystems, Hitachi) en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.



### 3.5.9. RT-PCR semicuantitativa

Los análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa se hicieron con ADNc procedente de ARN tratado del exocarpo de frutos de los distintos tratamientos. Como controles internos de la cantidad de ADNc en cada muestra se emplearon los genes de *Cucurbita pepo* de la proteína de fusión a ubiquitina (UFP) y del factor de elongación 1  $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) analizados por Obrero y cols. (2011). Para cada pareja de cebadores, se determinaron las condiciones de RT-PCR óptimas y el número de ciclos necesario para detectar señal, sin que ésta llegara a saturarse. Los productos resultantes de la amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% preparados en tampón TAE. La captura de imágenes se realizó con una cámara Quantum ST4 y el programa Quantum-Capt Advance (Vilber Lourmat, Torcy).

### 3.5.10. RT-PCR cuantitativa

Los análisis de expresión mediante RT-PCR cuantitativa se realizaron con ADNc sintetizado a partir de ARN tratado de los distintos tratamientos. Se empleó un sistema iCycler iQ5 equipado con el programa iCycler iQTM (Real Time Detection System Software, version 2.0) y la mezcla iQ SyBrGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La eficiencia de cada pareja de cebadores se determinó mediante diluciones seriadas. El gen de referencia utilizado fue el factor de elongación 1  $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). Los resultados obtenidos se analizaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

### 3.5.11. Herramientas bioinformáticas

Para los análisis moleculares, han sido utilizados distintos programas bioinformáticos. Los alineamientos de secuencias se realizaron con Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). La traducción de ADN a proteína se hizo con ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). El programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se empleó para los análisis de homologías. Los cebadores para los análisis por RT-PCR se hicieron con el programa Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>).



### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los experimentos se hicieron de manera aleatoria. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo usando los programas informáticos SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) y Statgraphics®Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA). Se realizaron análisis de la varianza uni y multifactorial, test de Fisher o de las mínimas diferencias significativas (MDS) y coeficientes de correlación simple entre variables.





## **4.RESULTADOS**







## **4.1. CAPÍTULO 1: Análisis varietal del comportamiento postcosecha de los frutos de calabacín**

En este capítulo, se analiza el comportamiento postcosecha de frutos de calabacín de distintas variedades híbridas comerciales cultivadas en la provincia de Almería. El objeto del mismo ha sido, en primer lugar, identificar diferentes respuestas frente al estrés por frío durante la postcosecha de los frutos para la selección de variedades más o menos sensibles, que puedan ser utilizadas en posteriores ensayos. Se ha llevado a cabo un estudio pormenorizado de distintos parámetros que en la bibliografía han sido relacionados con el estrés frente a las bajas temperaturas, especialmente en frutos durante la postcosecha.

### **4.4.1. Cambios físicos producidos durante la postcosecha de frutos de calabacín de distintas variedades**

Para llevar a cabo este trabajo, se han empleado frutos de las variedades híbridas comerciales Capea, Cónsul, Milenio, Natura y Sinatra suministrados por la empresa Mayes Exportación S.L. Los frutos se mantuvieron en cámaras de conservación a una temperatura controlada de 4, 12 y 20°C durante 7 y 14 días. De cada variedad, se tomaron frutos recién cosechados como control previo al almacenamiento (0 días). Tras el periodo de conservación, todos los frutos fueron sometidos a un proceso de aclimatación durante 24 horas a una temperatura de 20°C.

#### **a) Aspecto externo**

En la Figura 4.1.1, se observa el estado de los frutos recién cosechados de las distintas variedades utilizadas en este ensayo. Pasados 7 y 14 días de almacenamiento, los frutos presentaron el aspecto que se recoge en las Figuras 4.1.2 y 4.1.3. La conservación a 4°C tras 14 días causó el deterioro de los frutos de todas las variedades, siendo los frutos de la variedad Natura los mejor conservados en apariencia. Los frutos conservados a 12°C mantuvieron un aspecto externo que se asemejaba al de los frutos recién cosechados. A 20°C, algunos frutos manifestaron síntomas de deshidratación en la zona del fruto próxima al cierre pistilar (Flechas en Figuras 4.1.2 y 4.1.3). En la Figura 4.1.4, se presenta un detalle del exocarpo de los frutos conservados durante 14 días a 4°C.



Figura 4.1.1. Frutos recién cosechados de las variedades comerciales Caepa, Cónsul, Milenio, Natura y Sinatra.

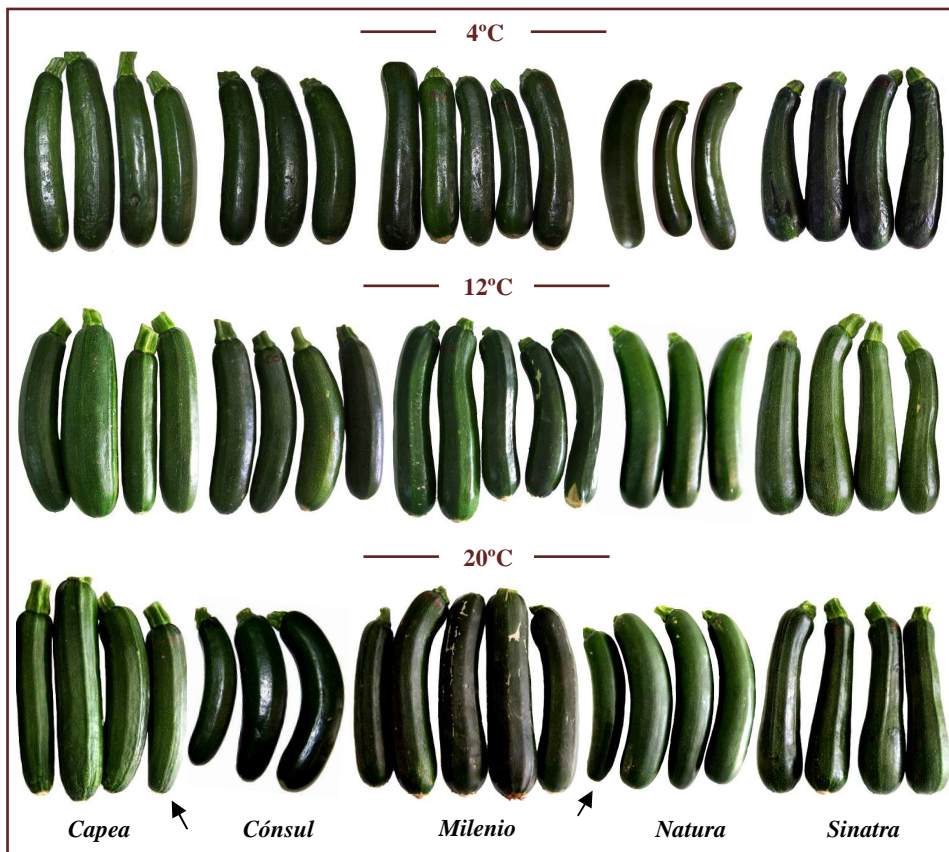
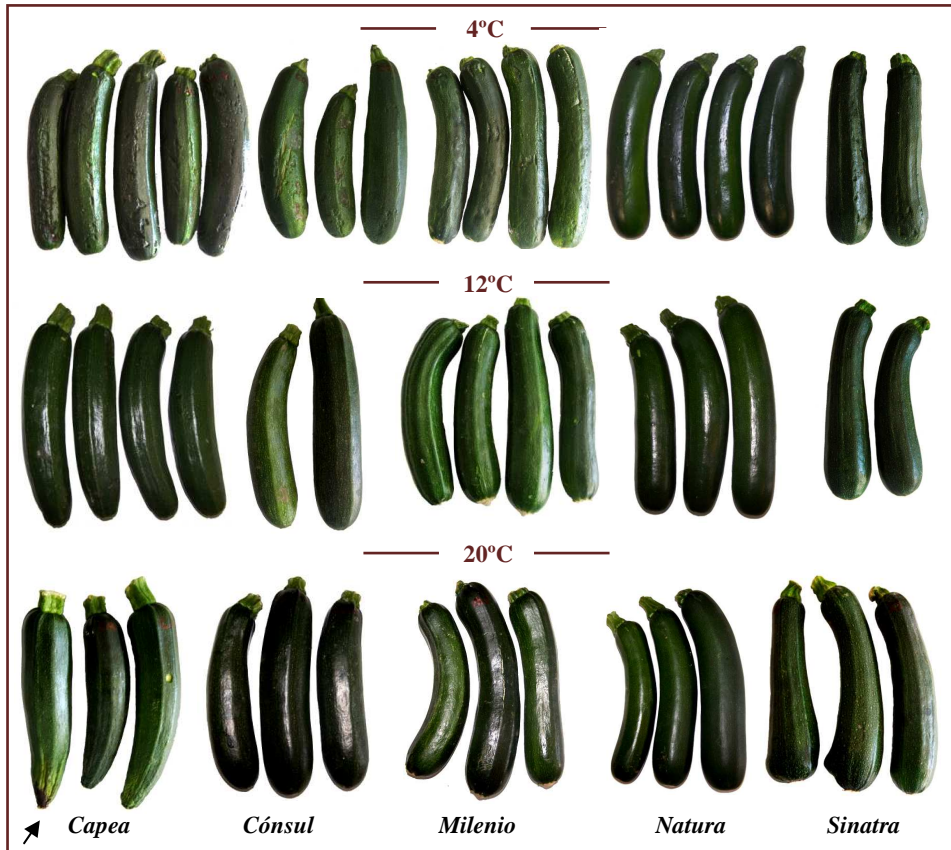
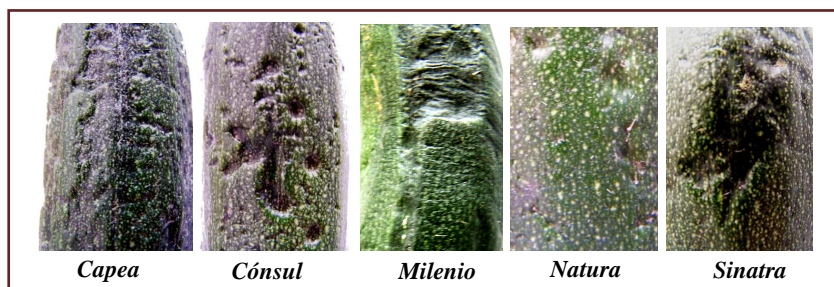


Figura 4.1.2. Frutos de las variedades comerciales Caepa, Cónsul, Milenio, Natura y Sinatra tras 7 días de conservación a 4, 12 y 20°C.



**Figura 4.1.3.** Frutos de las variedades comerciales Capea, Cónsul, Milenio, Natura y Sinatra tras 14 días de conservación a 4, 12 y 20°C.



**Figura 4.1.4.** Detalle del exocarpo de frutos de las variedades comerciales Capea, Cónsul, Milenio, Natura y Sinatra tras 14 días de conservación a 4°C.



### **b) Pérdida de peso**

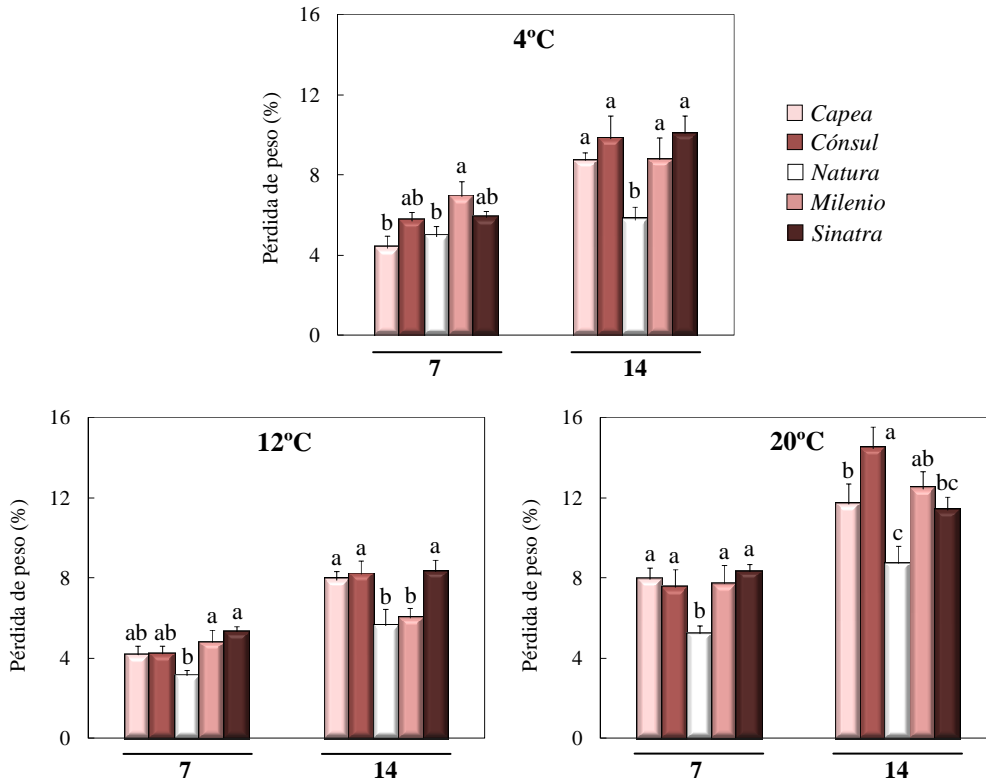
Como medida de la pérdida de agua se calculó el porcentaje de pérdida de peso de los frutos durante el almacenamiento (Figura 4.1.5). Las diferencias en la pérdida de peso entre 7 y 14 días para cada variedad se recogen en la Tabla 4.1.A1 del apéndice de este capítulo (Página 93). La mayor pérdida de peso se produce en los frutos almacenados a 20°C, coincidiendo con los síntomas de deshidratación que presentaron algunos de esos frutos (Figuras 4.1.2 y 3). En cambio, la conservación de los frutos a una temperatura moderada de 12°C resultó en un menor el porcentaje de pérdida de peso de los mismos. Los frutos Natura presentaron menos pérdida de peso tras el almacenamiento que los de las demás variedades estudiadas cuando se conservaron tanto a 4 como 12 y 20°C.

### **c) Daños por frío**

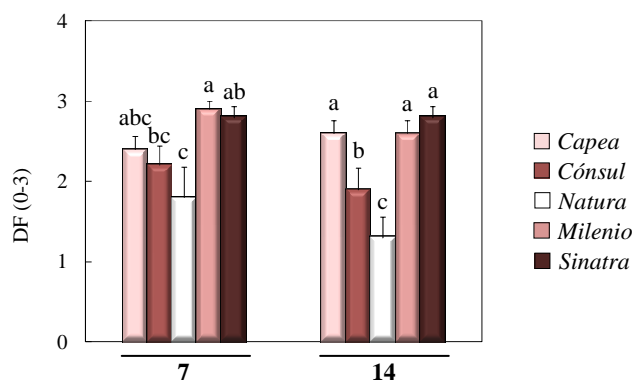
Los daños por frío (DF) desarrollados en los frutos almacenados a 4°C quedan recogidos en la Figura 4.1.6. La Tabla 4.1.A2 del apéndice del capítulo detalla el análisis de los cambios en este parámetro para cada variedad (Página 93). Los frutos Natura mostraron un índice de DF significativamente menor que el de las demás variedades. Esta variedad mostró el mismo comportamiento en los ensayos realizados tanto en otoño como en primavera. Los frutos Milenio y Sinatra, en cambio, presentaron un índice de DF cercano a 3, valor máximo de la escala empleada.

### **d) Análisis histológico**

Para observar los cambios estructurales que se producen en los tejidos de los frutos debido al desarrollo de DF, se realizó un análisis histológico mediante microscopía óptica (Figura 4.1.7). En frutos recién cosechados, el exocarpo se encuentra formado por una capa de células epidérmicas bien diferenciada bajo la cual se encuentran varias capas de células fotosintéticas. A medida que profundizamos en el fruto, podemos observar las células de mayor tamaño que constituyen el mesocarpo. Tras 14 días de frío, se produce una desorganización del tejido en las zonas del exocarpo dañadas.

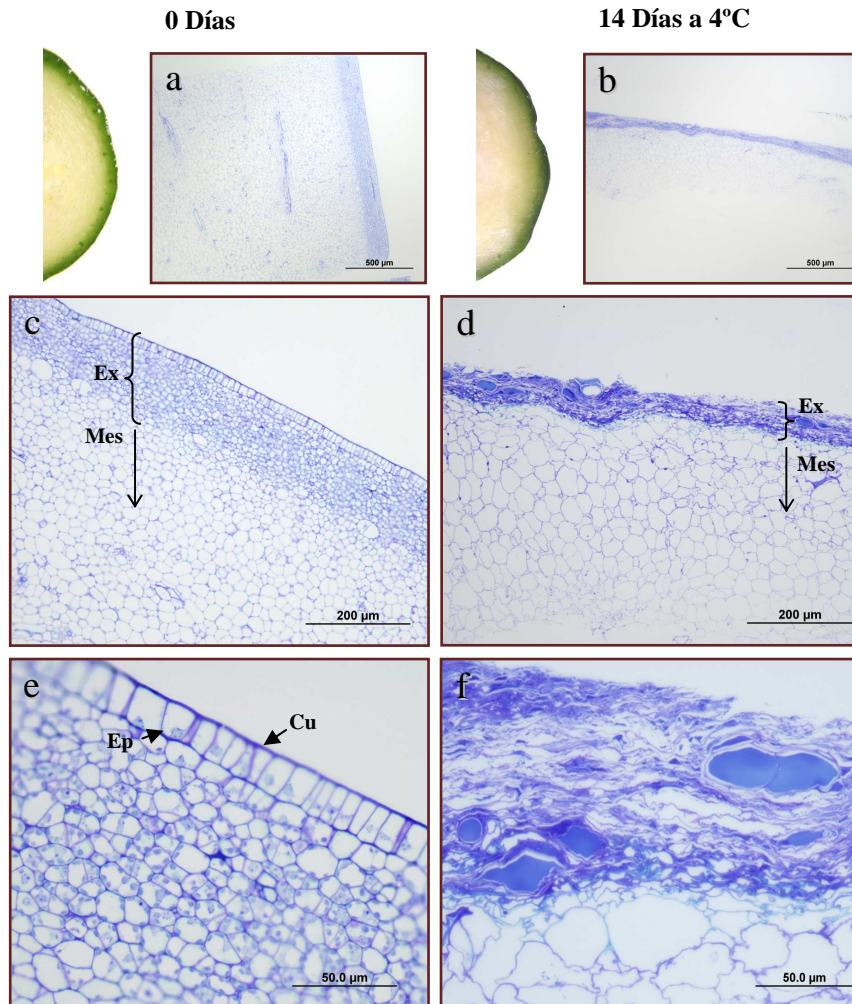


**Figura 4.1.5.** Porcentaje de pérdida de peso de frutos de calabacín de distintas variedades comerciales conservados a 4, 12 y 20°C durante 7 y 14 días. Los resultados son la media más el error estándar (n=10). Letras distintas indican diferencias significativas entre medias entre variedades para un mismo tiempo ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4.1.6.** Índice de daños por frío de frutos de calabacín de distintas variedades conservados a 4°C durante 7 y 14 días. Los resultados son la media más el error estándar (n=10). Letras distintas indican diferencias significativas entre medias entre variedades para un mismo tiempo ( $p < 0.05$ ).

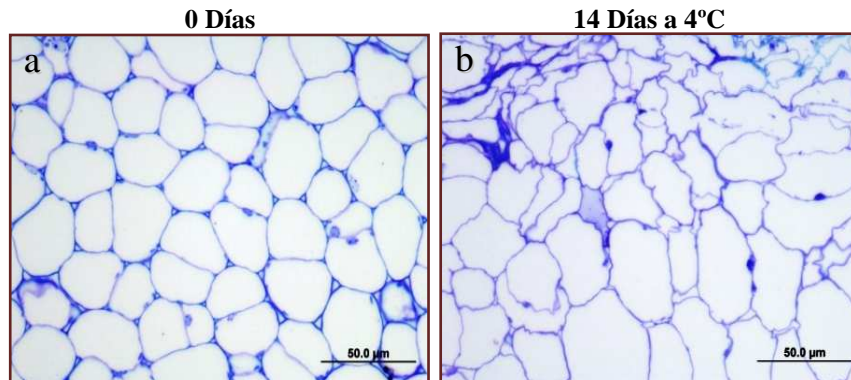




**Figura 4.1.7.** Cortes semifinos teñidos con azul de metileno y azul de toluidina de frutos de calabacín recién cosechados (a, c y d) y de una zona de exocarpo que presentaba síntomas severos de DF después de 14 días a 4°C (b, d y f). Ex: exocarpo, Mes: mesocarpo, Ep: epidermis, Cu: cutícula.

En la Figura 4.1.8, se muestra un detalle de los cambios producidos en el mesocarpo de los frutos. El almacenaje en frío también afecta a este tejido causando cambios morfológicos en las células que lo constituyen.





**Figura 4.1.8.** Cortes semifinos teñidos con azul de metileno y azul de toluidina de frutos del mesocarpo de frutos de calabacín recién cosechados (a) y después de 14 días a 4°C (b).

#### d) Análisis textural

Se realizó un análisis de los parámetros texturales **fracturabilidad, dureza, fuerza y adhesividad** (Tablas 4.1.1, 2 y 3). Las medidas se hicieron en tres partes del fruto: zona peduncular (zona 1), zona media (zona 2) y zona próxima al cierre pistilar (zona 3), como se indica en la Figura 3.1.1 del Material y Métodos (Página 41). Los valores altos de fracturabilidad pueden relacionarse tanto con una mayor firmeza del fruto como con una mayor elasticidad de los tejidos debido a la pérdida de agua. Sin embargo, la dureza y la fuerza se corresponden con la resistencia del tejido a la penetración de la sonda, por lo que serían indicativos de firmeza. En general, los parámetros analizados mostraron diferencias significativas entre variedades en las tres zonas. Los frutos Milenio alcanzaron los valores más altos en la mayoría de parámetros mientras que los frutos Sinatra mostraron medias similares o inferiores a las registradas en Natura. Estos resultados parecen indicar que las diferencias encontradas entre los frutos de las distintas variedades no se relacionan con la mayor o menor tolerancia al frío ni con el desarrollo de daños en los mismos.



**Tabla 4.1.1.** Parámetros texturales fracturabilidad (Kg), dureza (Kg), fuerza (Kg) y adhesividad (Kg s<sup>-1</sup>) obtenidos en la ZONA 1 de frutos de calabacín recién cosechados y tras 7 y 14 días de almacenamiento a 4, 12 y 20°C.

Parámetro/ Variedad	0 Días	7 Días			14 Días		
		4°C	12°C	20°C	4°C	12°C	20°C
<b>Fracturabilidad</b>							
<i>Capea</i>	1.88 <sup>a</sup>	2.11 <sup>b</sup>	2.01 <sup>c</sup>	2.29 <sup>b</sup>	2.35 <sup>ab</sup>	1.94 <sup>b</sup>	2.52 <sup>ab</sup>
<i>Cónsul</i>	1.69 <sup>ab</sup>	2.16 <sup>b</sup>	2.16 <sup>b</sup>	2.38 <sup>ab</sup>	2.27 <sup>b</sup>	2.05 <sup>b</sup>	2.42 <sup>ab</sup>
<i>Milenio</i>	1.91 <sup>a</sup>	2.51 <sup>a</sup>	2.34 <sup>a</sup>	2.40 <sup>ab</sup>	2.52 <sup>a</sup>	2.36 <sup>a</sup>	2.39 <sup>b</sup>
<i>Natura</i>	1.71 <sup>ab</sup>	2.05 <sup>b</sup>	1.97 <sup>c</sup>	2.52 <sup>a</sup>	2.27 <sup>b</sup>	2.00 <sup>b</sup>	2.73 <sup>a</sup>
<i>Sinatra</i>	1.58 <sup>b</sup>	2.09 <sup>b</sup>	1.96 <sup>c</sup>	1.97 <sup>c</sup>	2.35 <sup>ab</sup>	2.06 <sup>b</sup>	1.98 <sup>c</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.24	0.25	0.14	0.22	0.25	0.19	0.32
<i>p</i> -valor	*	**	***	***	ns	**	**
<b>Dureza</b>							
<i>Capea</i>	1.17 <sup>c</sup>	1.20 <sup>b</sup>	1.22 <sup>b</sup>	1.40 <sup>b</sup>	1.18 <sup>bc</sup>	1.03 <sup>d</sup>	1.80 <sup>a</sup>
<i>Cónsul</i>	1.26 <sup>b</sup>	1.22 <sup>b</sup>	1.47 <sup>a</sup>	1.61 <sup>a</sup>	1.25 <sup>b</sup>	1.36 <sup>b</sup>	1.79 <sup>a</sup>
<i>Milenio</i>	1.39 <sup>a</sup>	1.36 <sup>a</sup>	1.54 <sup>a</sup>	1.60 <sup>a</sup>	1.47 <sup>a</sup>	1.55 <sup>a</sup>	1.56 <sup>a</sup>
<i>Natura</i>	1.05 <sup>d</sup>	1.07 <sup>c</sup>	1.18 <sup>b</sup>	1.51 <sup>ab</sup>	1.12 <sup>c</sup>	1.23 <sup>c</sup>	1.80 <sup>a</sup>
<i>Sinatra</i>	1.05 <sup>d</sup>	0.95 <sup>d</sup>	1.04 <sup>c</sup>	0.95 <sup>c</sup>	0.98 <sup>d</sup>	0.83 <sup>e</sup>	0.95 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.06	0.12	0.09	0.17	0.12	0.12	0.28
<i>p</i> -valor	***	***	***	***	***	***	***
<b>Fuerza</b>							
<i>Capea</i>	1.10 <sup>bc</sup>	0.99 <sup>b</sup>	1.10 <sup>b</sup>	1.24 <sup>b</sup>	1.01 <sup>ab</sup>	1.02 <sup>c</sup>	1.69 <sup>a</sup>
<i>Cónsul</i>	1.19 <sup>b</sup>	0.94 <sup>bc</sup>	1.44 <sup>a</sup>	1.48 <sup>a</sup>	1.10 <sup>a</sup>	1.28 <sup>b</sup>	1.68 <sup>a</sup>
<i>Milenio</i>	1.43 <sup>a</sup>	1.21 <sup>a</sup>	1.53 <sup>a</sup>	1.48 <sup>a</sup>	0.99 <sup>ab</sup>	1.49 <sup>a</sup>	1.53 <sup>a</sup>
<i>Natura</i>	0.95 <sup>d</sup>	0.86 <sup>bc</sup>	1.08 <sup>b</sup>	1.32 <sup>ab</sup>	0.89 <sup>bc</sup>	1.13 <sup>bc</sup>	1.63 <sup>a</sup>
<i>Sinatra</i>	0.97 <sup>cd</sup>	0.78 <sup>c</sup>	0.91 <sup>c</sup>	0.87 <sup>c</sup>	0.72 <sup>c</sup>	0.73 <sup>d</sup>	0.86 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.15	0.21	0.18	0.20	0.21	0.19	0.39
<i>p</i> -valor	***	**	***	***	*	***	***
<b>Adhesividad</b>							
<i>Capea</i>	-0.07 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>ab</sup>	-0.06 <sup>ab</sup>	-0.11 <sup>b</sup>	-0.05 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>a</sup>	-0.17 <sup>bc</sup>
<i>Cónsul</i>	-0.09 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>a</sup>	-0.09 <sup>cd</sup>	-0.12 <sup>bc</sup>	-0.07 <sup>a</sup>	-0.09 <sup>b</sup>	-0.13 <sup>ab</sup>
<i>Milenio</i>	-0.09 <sup>a</sup>	-0.08 <sup>b</sup>	-0.10 <sup>d</sup>	-0.11 <sup>b</sup>	-0.08 <sup>a</sup>	-0.10 <sup>b</sup>	-0.12 <sup>ab</sup>
<i>Natura</i>	-0.07 <sup>a</sup>	-0.05 <sup>a</sup>	-0.08 <sup>bc</sup>	-0.15 <sup>c</sup>	-0.06 <sup>a</sup>	-0.09 <sup>b</sup>	-0.19 <sup>c</sup>
<i>Sinatra</i>	-0.07 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>a</sup>	-0.07 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>a</sup>	-0.05 <sup>a</sup>	-0.08 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.05
<i>p</i> -valor	ns	*	***	***	ns	***	**

Los datos son la media de 7 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre variedades para una misma temperatura y tiempo de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). Los niveles de significación están representados por \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y ns (no significativo).



**Tabla 4.1.2.** Parámetros texturales fracturabilidad (Kg), dureza (Kg), fuerza (Kg) y adhesividad (Kg s<sup>-1</sup>) obtenidos en la ZONA 2 de frutos de calabacín recién cosechados y tras 7 y 14 días de almacenamiento a 4, 12 y 20°C.

Parámetro/ Variedad	0 Días	7 Días			14 Días		
		4°C	12°C	20°C	4°C	12°C	20°C
<b>Fracturabilidad</b>							
<i>Caiepa</i>	1.85 <sup>a</sup>	2.01 <sup>b</sup>	1.87 <sup>bc</sup>	1.68 <sup>c</sup>	2.12 <sup>bc</sup>	1.82 <sup>b</sup>	1.62 <sup>c</sup>
<i>Cónsul</i>	1.74 <sup>b</sup>	2.01 <sup>b</sup>	1.91 <sup>bc</sup>	1.93 <sup>ab</sup>	2.21 <sup>ab</sup>	1.84 <sup>b</sup>	1.94 <sup>bc</sup>
<i>Milenio</i>	1.92 <sup>a</sup>	2.21 <sup>a</sup>	2.22 <sup>a</sup>	2.15 <sup>a</sup>	2.30 <sup>a</sup>	2.17 <sup>a</sup>	2.21 <sup>a</sup>
<i>Natura</i>	1.55 <sup>c</sup>	1.80 <sup>c</sup>	1.84 <sup>c</sup>	1.97 <sup>ab</sup>	2.05 <sup>c</sup>	1.77 <sup>b</sup>	1.98 <sup>ab</sup>
<i>Sinatra</i>	1.55 <sup>c</sup>	1.98 <sup>b</sup>	1.99 <sup>b</sup>	1.85 <sup>bc</sup>	2.05 <sup>c</sup>	1.89 <sup>b</sup>	1.63 <sup>bc</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.11	0.15	0.13	0.24	0.15	0.16	0.36
<i>p</i> -valor	***	***	***	**	**	***	**
<b>Dureza</b>							
<i>Caiepa</i>	1.02 <sup>b</sup>	1.14 <sup>ab</sup>	1.17 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>	1.04 <sup>ab</sup>	1.06 <sup>b</sup>	1.23 <sup>ab</sup>
<i>Cónsul</i>	0.92 <sup>b</sup>	0.98 <sup>c</sup>	0.90 <sup>b</sup>	0.99 <sup>b</sup>	0.90 <sup>bc</sup>	0.87 <sup>c</sup>	0.94 <sup>c</sup>
<i>Milenio</i>	1.16 <sup>a</sup>	1.17 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>	1.11 <sup>ab</sup>	1.16 <sup>a</sup>	1.26 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>
<i>Natura</i>	0.76 <sup>c</sup>	0.86 <sup>d</sup>	0.94 <sup>b</sup>	0.96 <sup>b</sup>	0.83 <sup>c</sup>	0.87 <sup>c</sup>	0.97 <sup>c</sup>
<i>Sinatra</i>	0.97 <sup>b</sup>	1.05 <sup>bc</sup>	1.18 <sup>a</sup>	1.06 <sup>b</sup>	1.09 <sup>a</sup>	1.11 <sup>ab</sup>	1.05 <sup>bc</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.13	0.11	0.13	0.17	0.17	0.17	0.21
<i>p</i> -valor	***	***	***	**	**	***	**
<b>Fuerza</b>							
<i>Caiepa</i>	0.68 <sup>ab</sup>	0.91 <sup>a</sup>	0.69 <sup>bc</sup>	0.94 <sup>a</sup>	0.74 <sup>a</sup>	0.75 <sup>bc</sup>	0.98 <sup>a</sup>
<i>Cónsul</i>	0.56 <sup>ab</sup>	0.61 <sup>bc</sup>	0.43 <sup>d</sup>	0.56 <sup>b</sup>	0.53 <sup>b</sup>	0.59 <sup>c</sup>	0.50 <sup>c</sup>
<i>Milenio</i>	0.75 <sup>a</sup>	0.78 <sup>ab</sup>	0.81 <sup>ab</sup>	0.58 <sup>b</sup>	0.76 <sup>a</sup>	1.03 <sup>ab</sup>	0.77 <sup>ab</sup>
<i>Natura</i>	0.49 <sup>b</sup>	0.56 <sup>c</sup>	0.58 <sup>cd</sup>	0.50 <sup>b</sup>	0.46 <sup>b</sup>	0.55 <sup>c</sup>	0.53 <sup>cd</sup>
<i>Sinatra</i>	0.62 <sup>ab</sup>	0.79 <sup>ab</sup>	0.91 <sup>a</sup>	0.64 <sup>b</sup>	0.75 <sup>a</sup>	1.11 <sup>a</sup>	0.66 <sup>cd</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.20	0.18	0.18	0.25	0.17	0.28	0.25
<i>p</i> -valor	ns	**	***	*	**	***	**
<b>Adhesividad</b>							
<i>Caiepa</i>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.05 <sup>ab</sup>	-0.07 <sup>bc</sup>	-0.03 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>ab</sup>	-0.08 <sup>c</sup>
<i>Cónsul</i>	-0.06 <sup>ab</sup>	-0.03 <sup>a</sup>	-0.05 <sup>ab</sup>	-0.06 <sup>ab</sup>	-0.03 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.05 <sup>ab</sup>
<i>Milenio</i>	-0.05 <sup>ab</sup>	-0.03 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.03 <sup>a</sup>	-0.05 <sup>abc</sup>	-0.03 <sup>a</sup>
<i>Natura</i>	-0.05 <sup>ab</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>b</sup>	-0.08 <sup>c</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.05 <sup>bc</sup>	-0.09 <sup>c</sup>
<i>Sinatra</i>	-0.06 <sup>b</sup>	-0.03 <sup>a</sup>	-0.05 <sup>ab</sup>	-0.07 <sup>bc</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>c</sup>	-0.07 <sup>bc</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.03
<i>p</i> -valor	ns	ns	ns	***	ns	ns	***

Los datos son la media de 7 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre variedades para una misma temperatura y tiempo de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). Los niveles de significación están representados por \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y ns (no significativo).



**Tabla 4.1.3.** Parámetros texturales fracturabilidad (Kg), dureza (Kg), fuerza (Kg) y adhesividad (Kg s<sup>-1</sup>) obtenidos en la ZONA 3 de frutos de calabacín recién cosechados y tras 7 y 14 días de almacenamiento a 4, 12 y 20°C.

Parámetro/ Variedad	0 Días	7 Días			14 Días		
		4°C	12°C	20°C	4°C	12°C	20°C
<b>Fracturabilidad</b>							
<i>Caiea</i>	1.72 <sup>a</sup>	1.82 <sup>bc</sup>	1.81 <sup>bc</sup>	1.38 <sup>c</sup>	2.07 <sup>ab</sup>	2.52 <sup>ab</sup>	1.22 <sup>d</sup>
<i>Cónsul</i>	1.68 <sup>a</sup>	1.91 <sup>b</sup>	1.85 <sup>bc</sup>	1.60 <sup>bc</sup>	2.04 <sup>ab</sup>	2.42 <sup>ab</sup>	1.40 <sup>cd</sup>
<i>Milenio</i>	1.73 <sup>a</sup>	2.14 <sup>a</sup>	2.22 <sup>a</sup>	2.16 <sup>a</sup>	2.23 <sup>a</sup>	2.39 <sup>b</sup>	2.29 <sup>a</sup>
<i>Natura</i>	1.46 <sup>b</sup>	1.75 <sup>c</sup>	2.05 <sup>b</sup>	1.70 <sup>bc</sup>	1.92 <sup>b</sup>	2.73 <sup>a</sup>	1.60 <sup>bc</sup>
<i>Sinatra</i>	1.36 <sup>b</sup>	1.93 <sup>b</sup>	1.71 <sup>c</sup>	1.72 <sup>b</sup>	2.13 <sup>ab</sup>	1.98 <sup>c</sup>	1.88 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.16	0.16	0.18	0.33	0.24	0.32	0.36
<i>p</i> -valor	***	***	***	**	ns	**	***
<b>Dureza</b>							
<i>Caiea</i>	0.92 <sup>b</sup>	1.13 <sup>a</sup>	0.84 <sup>b</sup>	0.97 <sup>a</sup>	1.01 <sup>b</sup>	1.80 <sup>a</sup>	1.07 <sup>a</sup>
<i>Cónsul</i>	0.91 <sup>b</sup>	0.89 <sup>b</sup>	0.95 <sup>b</sup>	0.91 <sup>a</sup>	0.83 <sup>b</sup>	1.79 <sup>a</sup>	0.74 <sup>b</sup>
<i>Milenio</i>	1.14 <sup>a</sup>	1.12 <sup>a</sup>	1.14 <sup>a</sup>	1.13 <sup>a</sup>	1.21 <sup>a</sup>	1.56 <sup>a</sup>	1.22 <sup>a</sup>
<i>Natura</i>	0.76 <sup>c</sup>	0.92 <sup>b</sup>	0.86 <sup>b</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.98 <sup>b</sup>	1.80 <sup>a</sup>	0.80 <sup>b</sup>
<i>Sinatra</i>	0.97 <sup>b</sup>	0.98 <sup>b</sup>	1.12 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.96 <sup>b</sup>	0.95 <sup>b</sup>	1.05 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.14	0.13	0.15	0.23	0.19	0.28	0.19
<i>p</i> -valor	***	**	***	ns	**	***	***
<b>Fuerza</b>							
<i>Caiea</i>	0.63 <sup>bc</sup>	0.77 <sup>ab</sup>	0.61 <sup>b</sup>	0.66 <sup>a</sup>	0.80 <sup>ab</sup>	1.69 <sup>a</sup>	0.92 <sup>a</sup>
<i>Cónsul</i>	0.75 <sup>ab</sup>	0.64 <sup>b</sup>	0.57 <sup>b</sup>	0.57 <sup>a</sup>	0.59 <sup>c</sup>	1.68 <sup>a</sup>	0.36 <sup>b</sup>
<i>Milenio</i>	0.93 <sup>a</sup>	0.93 <sup>a</sup>	0.74 <sup>b</sup>	0.69 <sup>a</sup>	0.90 <sup>a</sup>	1.53 <sup>a</sup>	0.99 <sup>a</sup>
<i>Natura</i>	0.49 <sup>c</sup>	0.74 <sup>ab</sup>	0.53 <sup>b</sup>	0.73 <sup>a</sup>	0.63 <sup>bc</sup>	1.63 <sup>a</sup>	0.45 <sup>b</sup>
<i>Sinatra</i>	0.81 <sup>ab</sup>	0.77 <sup>ab</sup>	1.02 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	0.68 <sup>bc</sup>	0.86 <sup>b</sup>	0.89 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.22	0.20	0.25	0.29	0.20	0.39	0.33
<i>p</i> -valor	**	ns	**	ns	*	***	***
<b>Adhesividad</b>							
<i>Caiea</i>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.02 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.02 <sup>a</sup>	-0.17 <sup>bc</sup>	-0.03 <sup>a</sup>
<i>Cónsul</i>	-0.05 <sup>a</sup>	-0.02 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.03 <sup>b</sup>	-0.13 <sup>ab</sup>	-0.03 <sup>a</sup>
<i>Milenio</i>	-0.06 <sup>b</sup>	-0.03 <sup>bc</sup>	-0.05 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>ab</sup>	-0.03 <sup>ab</sup>	-0.12 <sup>ab</sup>	-0.06 <sup>c</sup>
<i>Natura</i>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.02 <sup>ab</sup>	-0.04 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>ab</sup>	-0.02 <sup>a</sup>	-0.02 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>b</sup>
<i>Sinatra</i>	-0.06 <sup>b</sup>	-0.04 <sup>c</sup>	-0.05 <sup>a</sup>	-0.08 <sup>b</sup>	-0.04 <sup>b</sup>	-0.19 <sup>c</sup>	-0.10 <sup>d</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01	0.05	0.02
<i>p</i> -valor	***	**	ns	ns	**	**	***

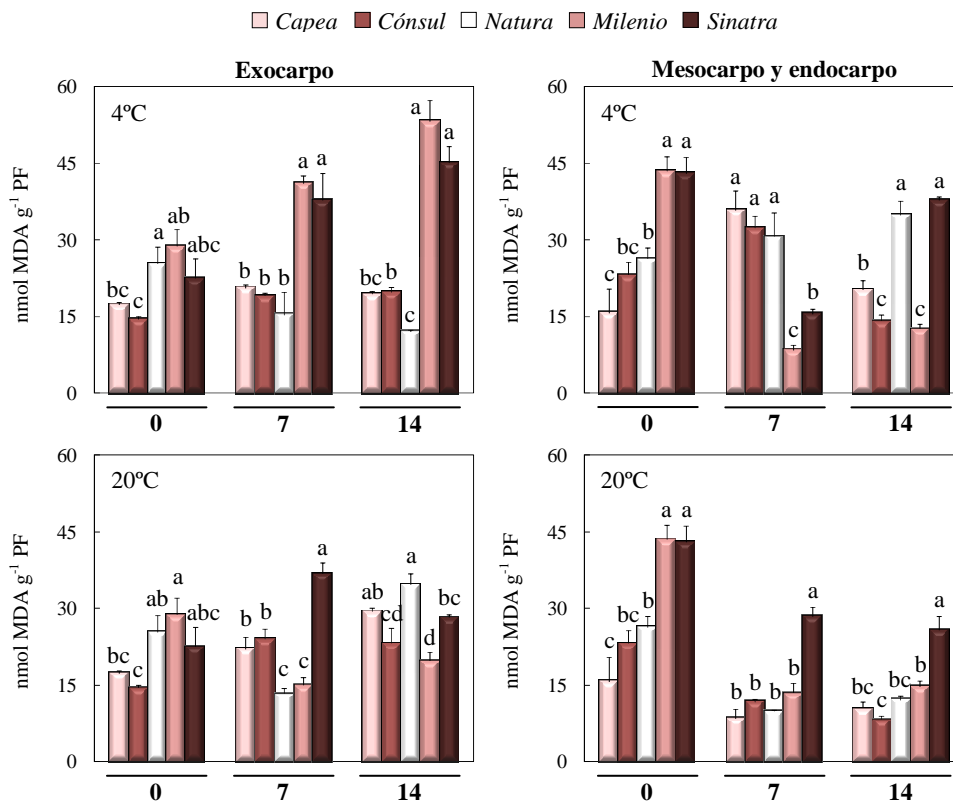
Los datos son la media de 7 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre variedades para una misma temperatura y tiempo de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). Los niveles de significación están representados por \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y ns (no significativo).



### 4.1.2. Cambios bioquímicos producidos durante la postcosecha de frutos de calabacín de distintas variedades

#### a) Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica, medida como contenido en malondialdehído (MDA), se muestra en la Figura 4.1.9. En la Tabla 4.1.A3 del apéndice, se presentan los datos con el análisis de los cambios a lo largo del tiempo para cada variedad (Página 94). Con el almacenamiento a 4°C, destaca el incremento que se produce en el contenido de MDA del exocarpo de los frutos Milenio y Sinatra, mientras que los frutos Natura presentan niveles menores. Estos resultados coinciden con el índice de daños por frío desarrollado en estas variedades.

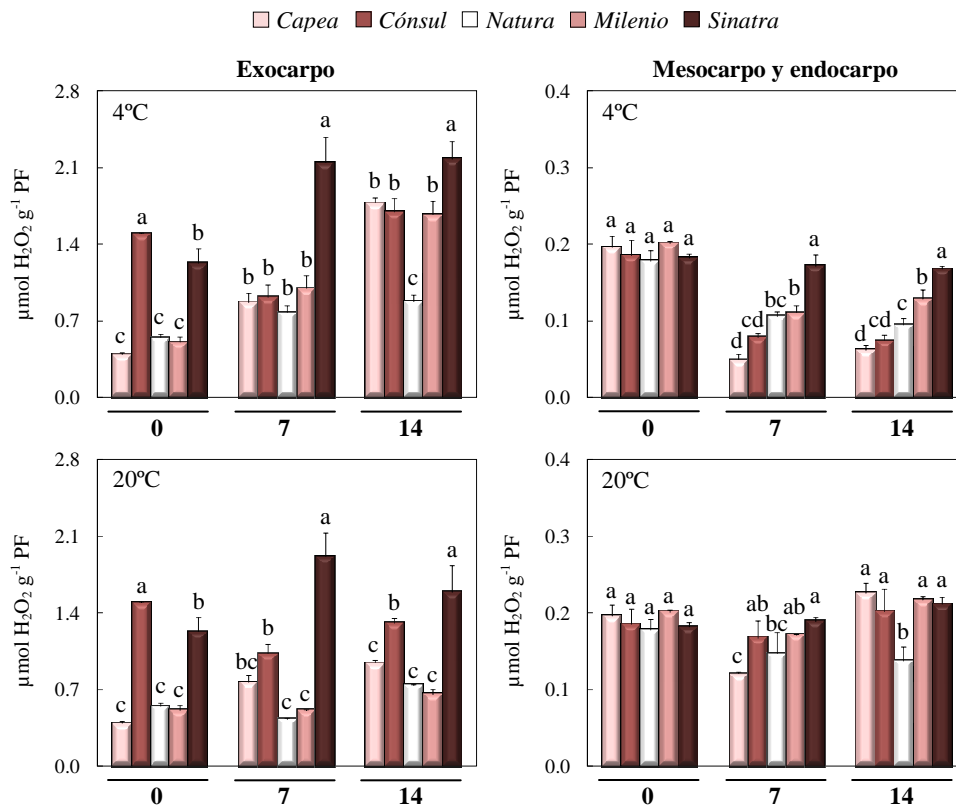


**Figura 4.1.9.** Peroxidación lipídica en frutos de calabacín recién cosechados y conservados a 4 y 20°C durante 7 y 14 días. Los resultados son la media más el error estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas entre variedades para un mismo tiempo ( $p < 0.05$ ).



### b) Peróxido de hidrógeno.

Los resultados de la cuantificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se recogen en la Figura 4.1.10 y en la Tabla 4.1.A4 del apéndice (Página 94). Se encontraron diferencias significativas entre variedades en el exocarpo de los frutos almacenados en frío, presentando los frutos Natura menos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al final del periodo de conservación. En general, en el exocarpo incrementa el contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la postcosecha, sin embargo, el aumento es mayor cuando los frutos se conservan a 4°C. El mesocarpo y endocarpo de los frutos conservados en frío disminuye sus niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, excepto en la variedad Sinatra, mientras que los resultados obtenidos a 20°C, en general, muestran una pequeña reducción a los 7 días, volviendo a aumentar al final de periodo de almacenaje.

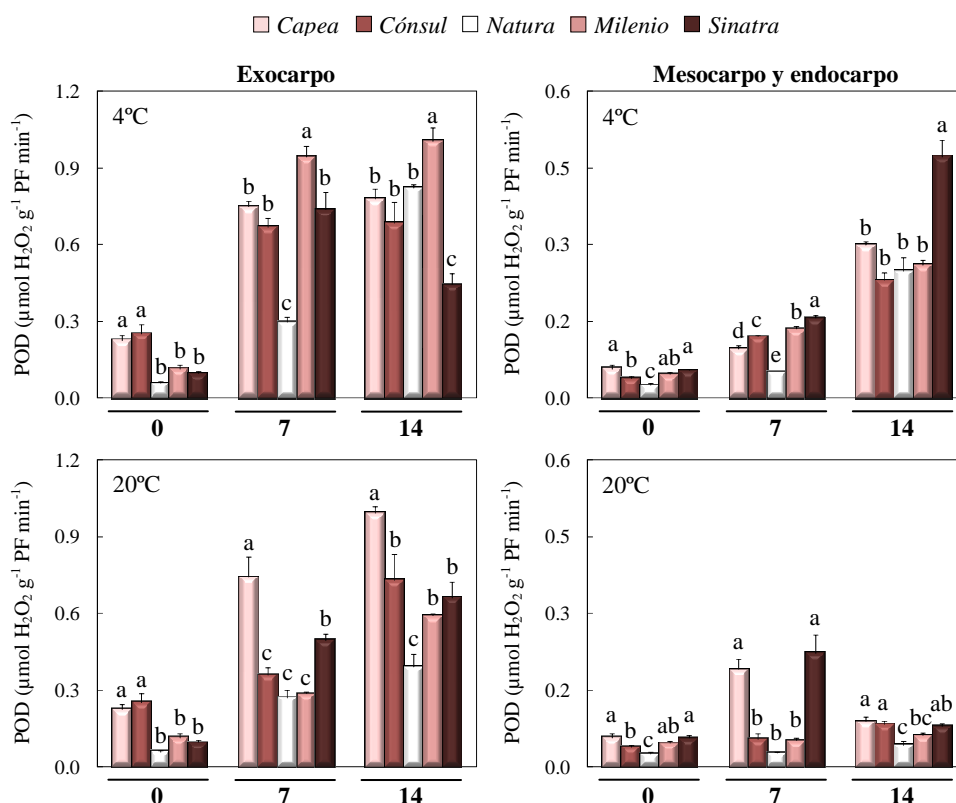


**Figura 4.1.10.** Niveles de peróxido de hidrógeno en frutos de calabacín de distintas variedades recién cosechados y tras el almacenamiento 7 y 14 días a 4 y 20°C. Los resultados son la media más el error estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas entre variedades para un mismo tiempo ( $p < 0.05$ ).



### c) Actividad peroxidasa total

Esta actividad se muestran en la Figura 4.1.13 y la Tabla 4.1.A5, Página 95. Los resultados mostraron un incremento en actividad durante la postcosecha de los frutos almacenados a las dos temperaturas estudiadas, siendo éste menor en el mesocarpo y endocarpo de los frutos conservados a 20°C.



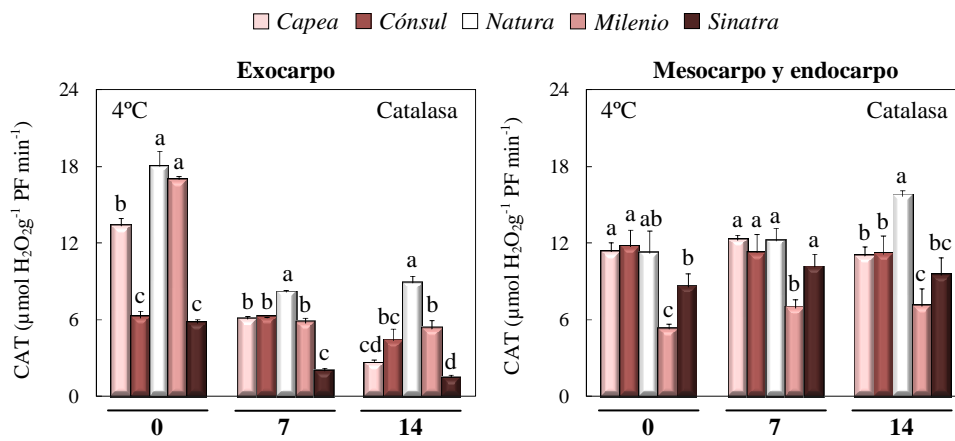
**Figura 4.1.13.** Actividad peroxidasa total (POD) en frutos de calabacín de distintas variedades recién cosechados y tras 7 y 14 días de almacenamiento a 4 y 20°C. Los resultados son la media más el error estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas entre variedades para un mismo tiempo ( $p < 0.05$ ).

### d) Actividad catalasa

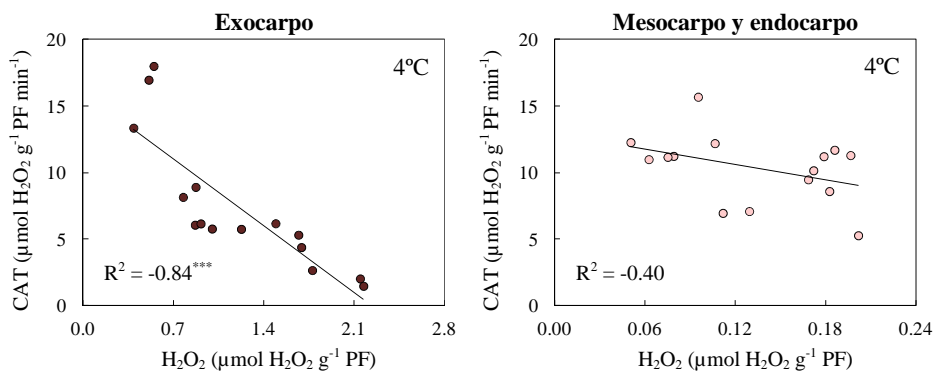
Los resultados obtenidos en el análisis de esta enzima se exponen en la Figura 4.1.11 y en la Tabla 4.1.A6 (Página 95). Los frutos Natura presentaron mayores niveles de esta actividad tras la conservación en frío y posterior



aclimatación que los de las demás variedades. En el mesocarpo y endocarpo de los frutos conservados en frío, esta actividad no cambia de forma significativa excepto en Natura, presentando en este caso un aumento tras 14 días a 4°C. La Figura 4.1.12 muestra la correlación existente entre el contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la actividad catalasa en los tejidos analizados. Tanto en exocarpo como en mesocarpo y endocarpo, los niveles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la actividad catalasa presentan una correlación negativa, sin embargo, ésta sólo es significativa en el caso del exocarpo ( $p < 0.01$ ).



**Figura 4.1.11.** Actividad catalasa (CAT) en frutos de calabacín de distintas variedades recién cosechados y después de 7 y 14 días de conservación a 4°C. Los resultados son la media más el error estándar ( $n=3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre variedades para un mismo tiempo ( $p < 0.05$ ).



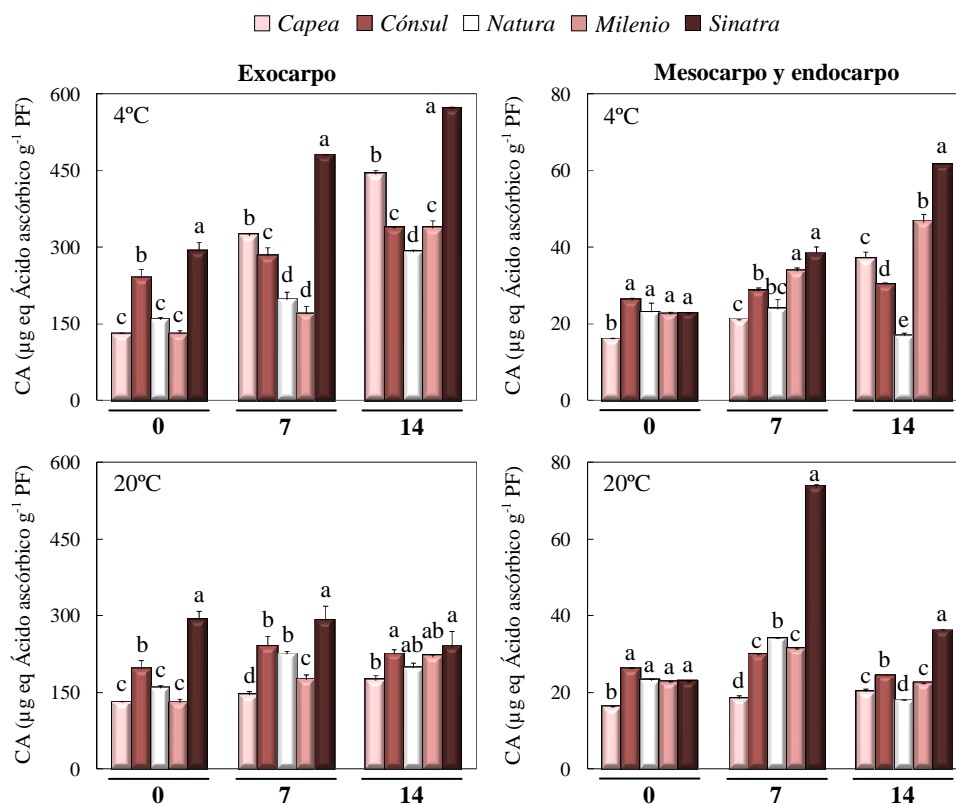
**Figura 4.1.12.** Correlación entre la actividad catalasa y el contenido en peróxido de hidrógeno tanto en exocarpo como en mesocarpo y endocarpo de frutos de calabacín conservados a 4°C. Nivel de significación:  $***p < 0.001$ .



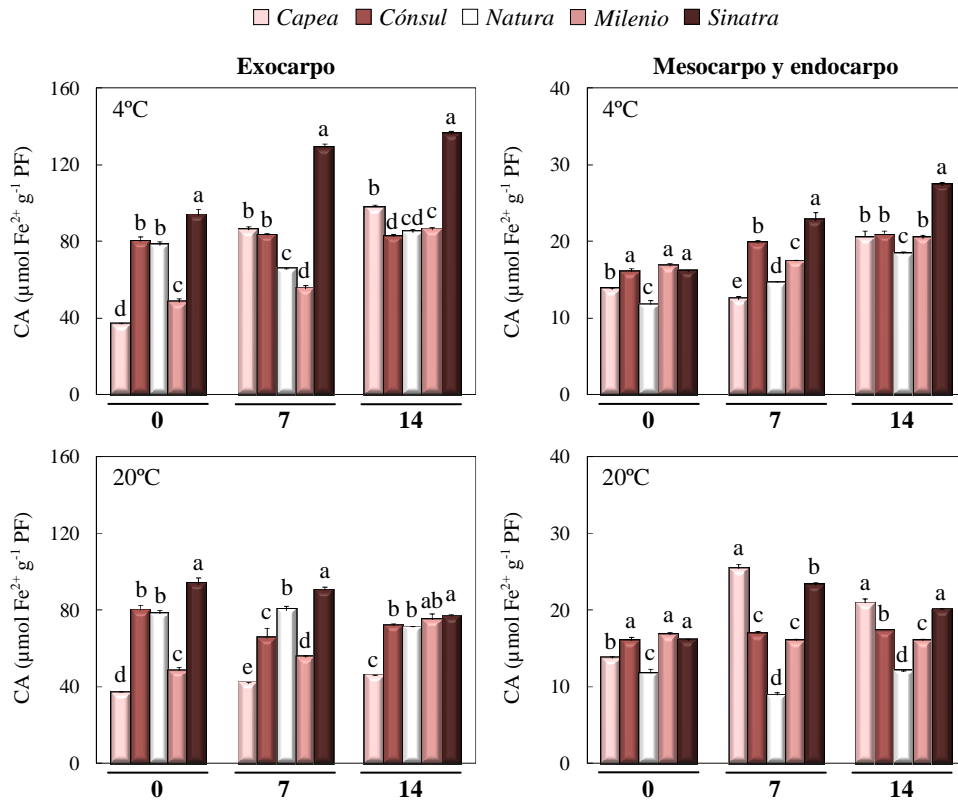


**e) Capacidad antioxidante total**

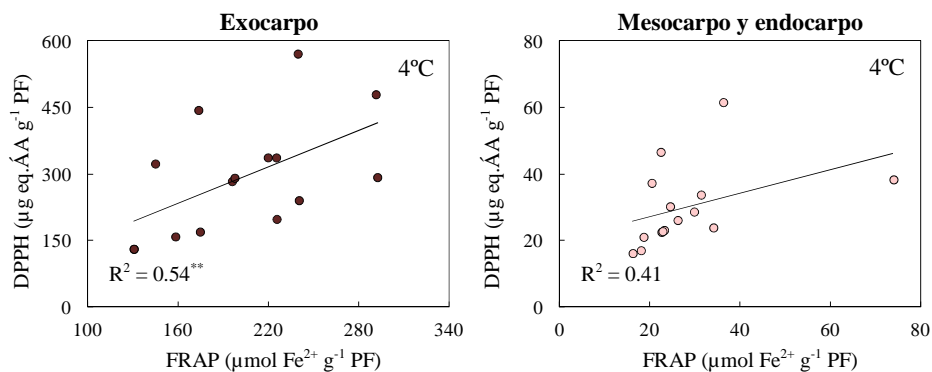
La capacidad antioxidante total se evaluó en los frutos de este ensayo mediante dos métodos: utilizando el radical DPPH y mediante el método FRAP. Los resultados obtenidos se recogen en las Figuras 4.1.14 y 15. El análisis dentro de cada variedad en los tiempos evaluados se recoge en las Tablas 4.1.A7 y 8 del apéndice (Página 96). Mediante ambas técnicas, se detectó un aumento en la capacidad antioxidante total en los frutos almacenados en frío, tanto en el exocarpo como en el mesocarpo y endocarpo de los mismos. Los frutos de la variedad Sinatra presentaron valores superiores a los de las demás variedades. En general, se producen menos cambios durante la conservación de los frutos a 20°C.



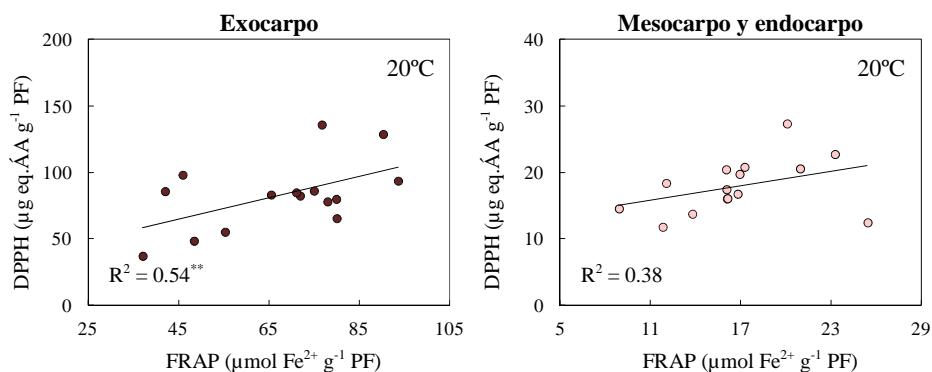
**Figura 4.1.14.** Capacidad antioxidante total (CA) determinada mediante el radical DPPH en frutos de calabacín de distintas variedades recién cosechados y tras 7 y 14 días de conservación a 4 y 20°C. Los resultados son la media más el error estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas entre variedades para un mismo tiempo ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4.1.15.** Capacidad antioxidante total (CA) medida por FRAP de frutos de calabacín de distintas variedades recién cosechados y tras el almacenaje durante 7 y 14 días a 4 y 20°C. Los resultados son la media más el error estándar ( $n=3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre variedades para un mismo tiempo ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4.1.16.** Correlación entre los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante por los métodos empleados (DPPH y FRAP) tanto en exocarpo como en mesocarpo y endocarpo de frutos de calabacín conservados a 4°C. Nivel de significación:  $**p < 0.005$ .

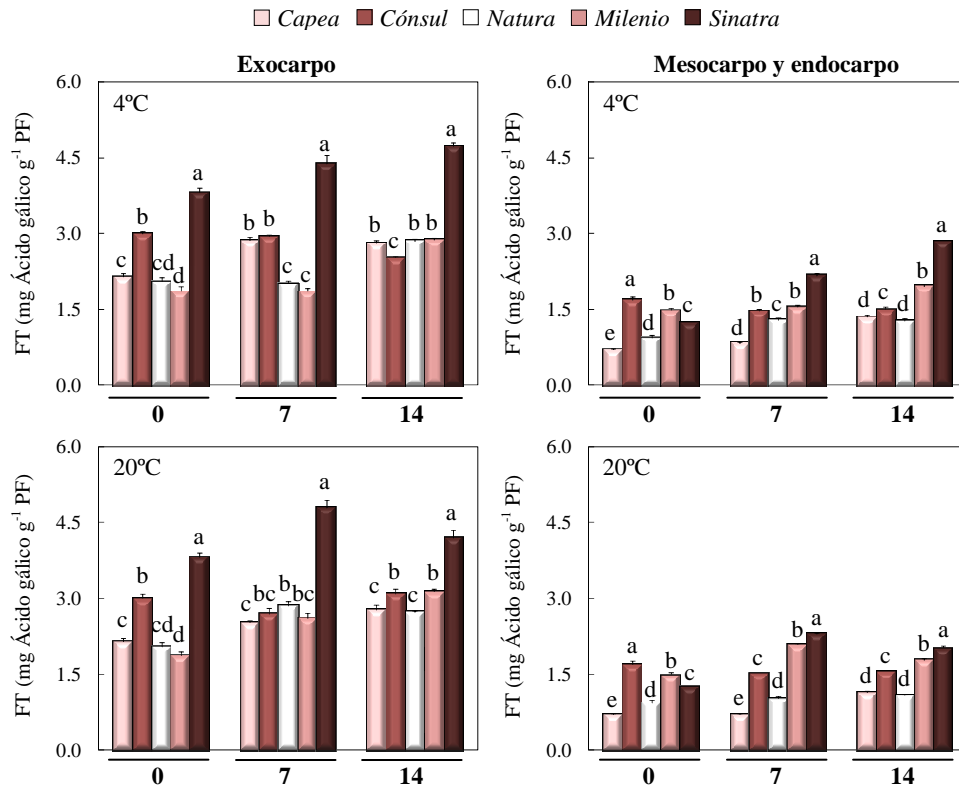


**Figura 4.1.17.** Correlación entre los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante por los métodos empleados (DPPH y FRAP) tanto en exocarpio como en mesocarpio y endocarpio de frutos de calabacín conservados a 4°C. Nivel de significación:  $**p < 0.05$ .

Las Figuras 4.1.16 y 17 muestran la correlación que existe entre los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante total utilizados en este trabajo. La correlación entre ambos métodos fue positiva en todos los casos, sin embargo, sólo fue significativa en el caso del exocarpio de los frutos conservados a las dos temperaturas de almacenamiento ( $p < 0.05$ )

#### f) Fenoles totales

En los frutos estudiados en este capítulo, se analizó el contenido en fenoles totales (Figura 4.1.18). El estudio estadístico de los datos recogido en la Tabla 4.1.A9 del apéndice muestra los cambios con el tiempo para cada variedad (Página 97). El contenido en fenoles totales fue mayor en el exocarpio que en el mesocarpio y endocarpio. En general, el nivel de estos compuestos incrementa con la postcosecha de los frutos tanto en los almacenados a 4°C como en los conservados a 20°C. Los frutos de Sinatra presentaron el contenido en fenoles más elevado, mientras que en los de Milenio la concentración fue similar a la encontrada en Natura. El nivel de estos compuestos no presentó correlación significativa con el desarrollo de DF.



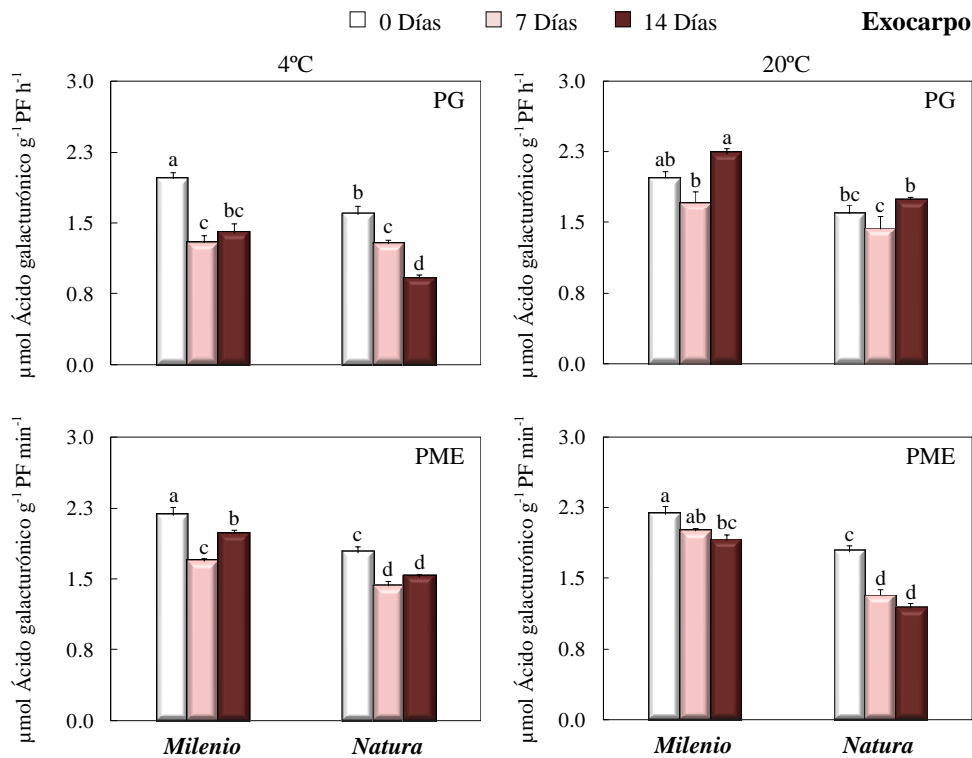
**Figura 4.1.18.** Contenido en fenoles totales (FT) de frutos de calabac3n de distintas variedades reci3n cosechados y despu3s de 7 y 14 d3as a 4 y 20°C. Los resultados son la media m3s el error est3ndar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas entre variedades para un mismo tiempo ( $p < 0.05$ ).

### 4.1.3. Enzimas modificadoras de la pared celular durante la conservaci3n de los frutos de calabac3n

Las actividades enzimáticas **poligalacturonasa** y **pectin metilesterasa** se determinaron en los frutos Milenio y Natura reci3n cosechados y conservados durante 7 y 14 d3as a 4 y 20°C. Como ejemplo de variedad sensible, se eligieron los frutos Milenio por los resultados obtenidos en los an3lisis de la textura en los que encontramos m3s diferencias con los frutos de la variedad Natura, 3nicos que presentaban cierto grado de tolerancia al fr3o. Los resultados obtenidos para el exocarpo y el mesocarpo y endocarpo se muestran en las



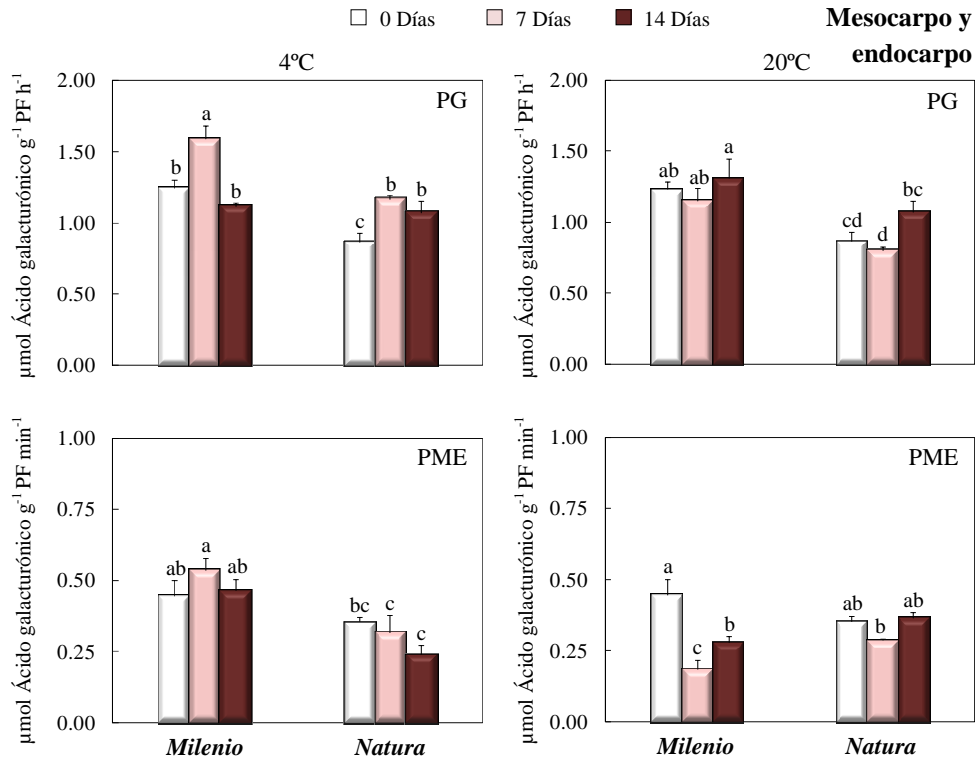
Figuras 4.1.19 y 4.1.20 respectivamente. En el exocarpo de frutos de ambas variedades almacenados a 4°C, la actividad PG disminuyó, siendo menor los niveles de actividad detectados en la variedad más tolerante al frío al final del tiempo de conservación. Cuando los frutos se mantuvieron a 20°C, tuvo lugar un incremento de esta actividad en el exocarpo tras 14 días de almacenamiento. La actividad PME también disminuyó en el exocarpo durante la postcosecha de los frutos tanto a 4 como a 20°C. En los frutos conservados en frío, se produce un aumento a los 14 días que no llega a ser significativo en la variedad Natura. En el mesocarpo y endocarpo de los frutos, la actividad PG aumenta a los 7 días de frío en ambas variedades, mientras que a 20°C, presenta pocos cambios. La actividad PME en mesocarpo y endocarpo a 4°C no cambia en Sinatra mientras que disminuye en Natura. A 20°C, esta actividad presenta un pequeño aumento al final del tiempo de almacenaje.



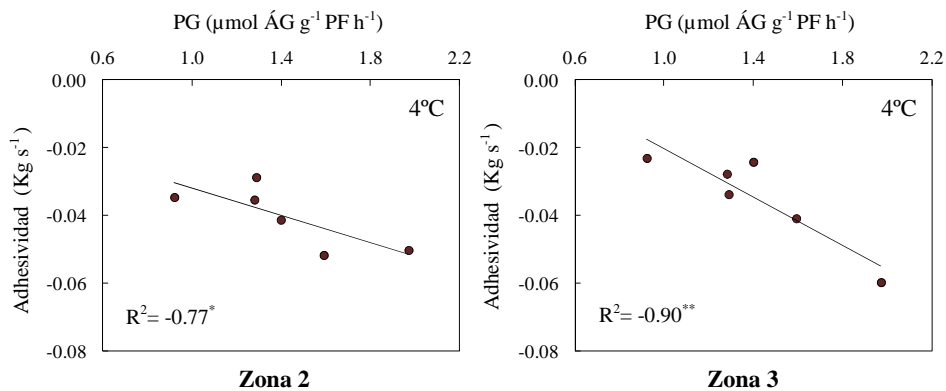
**Figura 4.1.19.** Diferencias en las actividades PG y PME en el exocarpo de frutos de calabacín de las variedades Milenio y Natura con la conservación a 4 y 20°C. Los resultados representan la media (n=3) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



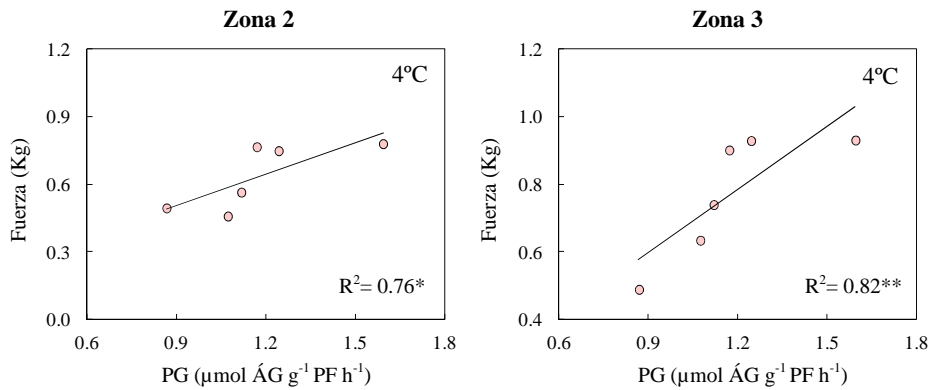
## Resultados



**Figura 4.1.20.** Diferencias en las actividades PG y PME en el mesocarpio y endocarpo de frutos de calabacín de las variedades Milenio y Natura con la conservación a 4 y 20°C. Los resultados representan la media ( $n=3$ ) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4.1.22.** Correlación entre la actividad PG en exocarpo y el parámetro textural adhesividad en frutos de calabacín conservados a 4°C. Niveles de significación:  $**p < 0.05$  y  $*p < 0.01$ .



**Figura 4.1.23.** Correlación entre la actividad PG en mesocarpo y endocarpo y el parámetro textural fuerza en frutos de calabacín conservados a 4°C. Niveles de significación:  $^{**}p < 0.05$  y  $^*p < 0.01$ .

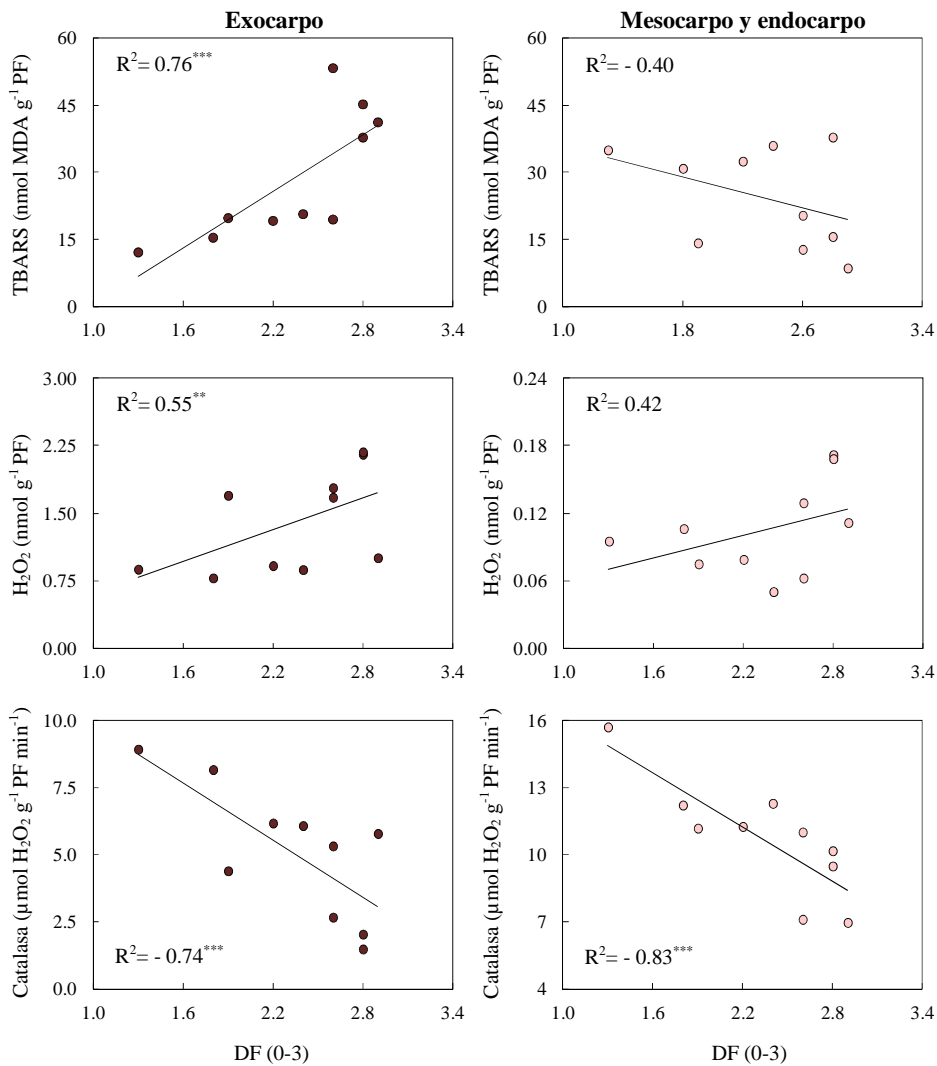
Se ha realizado un análisis de la posible correlación existente entre estas actividades enzimáticas y los parámetros texturales analizados en los frutos de estas variedades conservados a 4 y 20°C (Figuras 4.1.22 y 23). Se encontró una correlación negativa entre el parámetro adhesividad en las zonas 2 y 3 de los frutos conservados a 4°C y la actividad PG en el exocarpo de los mismos. También se encontró una correlación positiva entre el parámetro textural fuerza en las zonas 2 y 3 de los frutos almacenados en frío y la actividad PG en el mesocarpo y endocarpo.

#### 4.1.4. Correlación entre las determinaciones realizadas y los DF

Con objeto de relacionar los diferentes parámetros, metabolitos y actividades enzimáticas analizados en este capítulo con el desarrollo de daños por frío en los frutos almacenados a 4°C, se realizó un estudio de la correlación existente entre cada uno de los resultados de las distintas determinaciones y el índice de daños por frío presentado por los frutos estudiados. El porcentaje de pérdida de peso no se correlacionó positivamente con el índice de daños por frío. Esto se debe a que los frutos desarrollaron los daños de forma rápida, presentado el mismo índice a los 7 y 14 días de frío, mientras que la pérdida de peso aumentó de forma progresiva. En otros experimentos realizados en épocas diferentes de recolección, esta correlación fue positiva debido al desarrollo gradual de los daños por frío en los frutos. Los metabolitos que se correlacionan



de forma positiva con los daños por frío desarrollados por los frutos son el contenido en MDA y en  $H_2O_2$ , mientras que la actividad catalasa se correlaciona negativamente con los mismos (Figura 4.1.24).



**Figura 4.1.24.** Correlación entre el índice de daños por frío y la peroxidación lipídica, el contenido en  $H_2O_2$  y la actividad catalasa tanto en exocarpo como en mesocarpo y endocarpo de frutos de calabacín conservados a 4°C. Niveles de significación: \*\*\* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.05$ .





#### 4.1.5. Apéndice

En este apéndice se recogen los datos presentados en el capítulo 1 con el análisis estadístico de los cambios que se producen a lo largo del tiempo para cada variedad.

**Tabla 4.1.A1.** Porcentaje de **pérdida de peso** de frutos de calabacín conservados 7 y 14 días a 4, 12 y 20°C.

Temperatura/ Días	<i>Caepa</i>	<i>Cónsul</i>	<i>Milenio</i>	<i>Natura</i>	<i>Sinatra</i>
<b>Conservación a 4°C</b>					
7	4.37 <sup>b</sup>	5.74 <sup>b</sup>	6.95 <sup>a</sup>	4.94 <sup>a</sup>	5.88 <sup>b</sup>
14	8.72 <sup>a</sup>	9.82 <sup>a</sup>	8.77 <sup>a</sup>	5.78 <sup>a</sup>	10.10 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	1.56	2.61	2.78	1.71	1.94
<b>Conservación a 12°C</b>					
7	4.18 <sup>b</sup>	4.21 <sup>b</sup>	4.80 <sup>a</sup>	3.14 <sup>b</sup>	5.31 <sup>b</sup>
14	7.92 <sup>a</sup>	8.21 <sup>a</sup>	6.02 <sup>a</sup>	5.61 <sup>a</sup>	8.32 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	1.30	1.59	1.69	1.90	1.36
<b>Conservación a 20°C</b>					
7	7.95 <sup>b</sup>	7.53 <sup>b</sup>	7.71 <sup>b</sup>	4.95 <sup>b</sup>	8.34 <sup>b</sup>
14	11.69 <sup>a</sup>	14.48 <sup>a</sup>	12.47 <sup>a</sup>	8.72 <sup>a</sup>	10.62 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	2.46	2.92	2.60	2.02	1.71

Los datos son la media de 10 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma variedad ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 4.1.A2.** Índice de **DF** de los frutos almacenados a 4°C.

DF (0-3)/ Días	<i>Caepa</i>	<i>Cónsul</i>	<i>Milenio</i>	<i>Natura</i>	<i>Sinatra</i>
<b>DF (0-3) a 4°C</b>					
7	2.40 <sup>a</sup>	2.20 <sup>a</sup>	2.90 <sup>a</sup>	1.80 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a</sup>
14	2.60 <sup>a</sup>	1.90 <sup>a</sup>	2.60 <sup>a</sup>	1.30 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.49	0.78	0.40	0.98	0.40

Los datos son la media de 10 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma variedad ( $p < 0.05$ ).



**Tabla 4.1.A3. Peroxidación lipídica** (nmol MDA g<sup>-1</sup>PF) de frutos de calabacín recién cosechados y después de 7 y 14 días a 4 y 20°C.

Tejido/Días de almacenamiento	Capea		Cónsul		Milenio		Natura		Sinatra	
	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C
<b>Exocarpo</b>										
0	17.4 <sup>b</sup>	17.4 <sup>c</sup>	14.6 <sup>b</sup>	14.6 <sup>b</sup>	28.8 <sup>c</sup>	28.8 <sup>a</sup>	25.4 <sup>a</sup>	25.4 <sup>a</sup>	22.6 <sup>b</sup>	22.6 <sup>b</sup>
7	20.7 <sup>a</sup>	22.1 <sup>b</sup>	19.2 <sup>a</sup>	24.0 <sup>a</sup>	41.2 <sup>b</sup>	13.4 <sup>b</sup>	15.4 <sup>ab</sup>	15.0 <sup>b</sup>	37.8 <sup>a</sup>	36.8 <sup>a</sup>
14	19.5 <sup>a</sup>	29.5 <sup>a</sup>	19.8 <sup>a</sup>	23.2 <sup>a</sup>	53.3 <sup>a</sup>	34.7 <sup>a</sup>	12.1 <sup>b</sup>	19.8 <sup>ab</sup>	50.1 <sup>a</sup>	28.3 <sup>ab</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	1.8	4.7	2.5	7.2	10.8	8.1	10.8	8.1	14.4	8.6
<b>Meso y endocarpo</b>										
0	15.7 <sup>b</sup>	15.7 <sup>a</sup>	23.2 <sup>b</sup>	23.2 <sup>a</sup>	43.5 <sup>a</sup>	43.5 <sup>a</sup>	26.3 <sup>a</sup>	26.3 <sup>a</sup>	43.0 <sup>a</sup>	43.0 <sup>a</sup>
7	35.9 <sup>a</sup>	8.5 <sup>a</sup>	32.4 <sup>a</sup>	11.8 <sup>b</sup>	8.5 <sup>b</sup>	12.9 <sup>b</sup>	30.8 <sup>a</sup>	13.6 <sup>b</sup>	15.6 <sup>b</sup>	28.5 <sup>b</sup>
14	20.3 <sup>b</sup>	10.6 <sup>a</sup>	14.1 <sup>c</sup>	8.3 <sup>b</sup>	12.7 <sup>b</sup>	12.2 <sup>b</sup>	34.9 <sup>a</sup>	14.8 <sup>b</sup>	37.8 <sup>a</sup>	25.8 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	12.6	10.4	5.8	5.2	5.2	7.7	11.6	5.0	6.8	9.1

Los datos son la media de 3 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma variedad ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 4.1.A4. Niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** (μmol g<sup>-1</sup>PF) de frutos de calabacín recién cosechados y después de 7 y 14 días a 4 y 20°C.

Tejido/Días de almacenamiento	Capea		Cónsul		Milenio		Natura		Sinatra	
	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C
<b>Exocarpo</b>										
0	0.39 <sup>c</sup>	0.39 <sup>c</sup>	1.49 <sup>a</sup>	1.49 <sup>a</sup>	0.51 <sup>c</sup>	0.51 <sup>b</sup>	0.55 <sup>b</sup>	0.55 <sup>b</sup>	1.23 <sup>b</sup>	1.23 <sup>a</sup>
7	0.87 <sup>b</sup>	0.77 <sup>b</sup>	0.91 <sup>b</sup>	1.03 <sup>b</sup>	1.00 <sup>b</sup>	0.51 <sup>b</sup>	0.78 <sup>a</sup>	0.43 <sup>c</sup>	2.15 <sup>a</sup>	1.59 <sup>a</sup>
14	1.78 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>	1.69 <sup>a</sup>	1.31 <sup>b</sup>	1.67 <sup>a</sup>	0.66 <sup>a</sup>	0.87 <sup>a</sup>	0.74 <sup>a</sup>	2.17 <sup>a</sup>	1.92 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.20	0.15	0.34	0.19	0.35	0.13	0.18	0.06	0.62	0.71
<b>Meso y endocarpo</b>										
0	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.18 <sup>b</sup>
7	0.05 <sup>b</sup>	0.12 <sup>b</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.17 <sup>a</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.17 <sup>c</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	0.19 <sup>ab</sup>
14	0.06 <sup>b</sup>	0.23 <sup>a</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.13 <sup>b</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.14 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.01	0.03	0.06	0.03	0.02

Los datos son la media de 3 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma variedad ( $p < 0.05$ ).



**Tabla 4.1.A5.** Actividad **catalasa** ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{PF}$ ) en frutos de calabacín recién cosechados y después de 7 y 14 días a 4°C.

Tejido/Días de almacenamiento	<i>Caïpea</i>	<i>Cónsul</i>	<i>Milenio</i>	<i>Natura</i>	<i>Sinatra</i>
<b>Exocarpo</b>					
0	13.4 <sup>a</sup>	6.2 <sup>a</sup>	17.0 <sup>a</sup>	18.0 <sup>a</sup>	5.7 <sup>a</sup>
7	6.1 <sup>b</sup>	6.2 <sup>a</sup>	5.8 <sup>b</sup>	8.1 <sup>b</sup>	2.0 <sup>b</sup>
14	2.6 <sup>c</sup>	4.4 <sup>a</sup>	5.3 <sup>b</sup>	8.9 <sup>b</sup>	1.5 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	1.3	2.1	1.6	2.7	0.7
<b>Meso y endocarpo</b>					
0	11.3 <sup>a</sup>	11.7 <sup>a</sup>	5.3 <sup>a</sup>	11.2 <sup>b</sup>	8.6 <sup>a</sup>
7	12.3 <sup>a</sup>	11.2 <sup>a</sup>	6.9 <sup>a</sup>	12.2 <sup>b</sup>	10.2 <sup>a</sup>
14	11.0 <sup>a</sup>	11.2 <sup>a</sup>	7.1 <sup>a</sup>	15.7 <sup>a</sup>	9.5 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	2.1	4.9	3.1	2.5	4.0

Los datos son la media de 3 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma variedad ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 4.1.A6.** Actividad **peroxidasa total** ( $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{PF}$ ) de frutos de calabacín recién cosechados y después de 7 y 14 días a 4 y 20°C.

Tejido/Días de almacenamiento	<i>Caïpea</i>		<i>Cónsul</i>		<i>Milenio</i>		<i>Natura</i>		<i>Sinatra</i>	
	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C
<b>Exocarpo</b>										
0	0.23 <sup>b</sup>	0.23 <sup>c</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.11 <sup>c</sup>	0.06 <sup>c</sup>	0.06 <sup>c</sup>	0.10 <sup>c</sup>	0.10 <sup>c</sup>
7	0.75 <sup>a</sup>	0.74 <sup>b</sup>	0.67 <sup>a</sup>	0.36 <sup>b</sup>	0.93 <sup>a</sup>	0.29 <sup>b</sup>	0.30 <sup>b</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.49 <sup>b</sup>
14	0.78 <sup>a</sup>	0.99 <sup>a</sup>	0.68 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	1.01 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>	0.82 <sup>a</sup>	0.39 <sup>a</sup>	0.74 <sup>a</sup>	0.66 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.09	0.17	0.19	0.22	0.14	0.04	0.05	0.12	0.16	0.14
<b>Meso y endocarpo</b>										
0	0.06 <sup>c</sup>	0.06 <sup>b</sup>	0.04 <sup>c</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.05 <sup>c</sup>	0.05 <sup>b</sup>
7	0.10 <sup>b</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.12 <sup>b</sup>	0.05 <sup>ab</sup>	0.94 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.16 <sup>b</sup>	0.22 <sup>a</sup>
14	0.29 <sup>a</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.23 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	1.01 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.47 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.02	0.04	0.03	0.03	0.14	0.02	0.05	0.01	0.07	0.07

Los datos son la media de 3 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma variedad ( $p < 0.05$ ).



**Tabla 4.1.A7. Capacidad antioxidante total** ( $\mu\text{g eq \u00c1cido asc\u00f3rbico g}^{-1}$  PF) de frutos de calabac\u00edn reci\u00e9n cosechados y despu\u00e9s de 7 y 14 d\u00edas a 4 y 20\u00b0C.

Tejido/D\u00edas de almacenamiento	Capea		C\u00f3nsul		Milenio		Natura		Sinatra	
	4\u00b0C	20\u00b0C	4\u00b0C	20\u00b0C	4\u00b0C	20\u00b0C	4\u00b0C	20\u00b0C	4\u00b0C	20\u00b0C
<b>Exocarpo</b>										
0	130.8 <sup>c</sup>	130.8 <sup>b</sup>	240.5 <sup>b</sup>	240.5 <sup>a</sup>	130.8 <sup>b</sup>	130.8 <sup>c</sup>	158.5 <sup>c</sup>	158.5 <sup>c</sup>	292.6 <sup>c</sup>	292.6 <sup>a</sup>
7	323.1 <sup>b</sup>	145.1 <sup>b</sup>	283.4 <sup>b</sup>	196.0 <sup>a</sup>	169.5 <sup>b</sup>	174.8 <sup>b</sup>	198.2 <sup>b</sup>	197.8 <sup>b</sup>	479.4 <sup>b</sup>	291.6 <sup>a</sup>
14	443.9 <sup>a</sup>	173.8 <sup>a</sup>	336.9 <sup>a</sup>	225.5 <sup>a</sup>	337.0 <sup>a</sup>	219.9 <sup>a</sup>	291.2 <sup>a</sup>	225.7 <sup>a</sup>	571.4 <sup>a</sup>	239.8 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	15.5	22.8	46.0	54.0	44.8	24.1	32.4	24.5	34.7	88.3
<b>Meso y endocarpo</b>										
0	16.1 <sup>c</sup>	16.1 <sup>b</sup>	26.1 <sup>b</sup>	26.1 <sup>b</sup>	22.5 <sup>c</sup>	22.5 <sup>b</sup>	23.1 <sup>a</sup>	23.1 <sup>b</sup>	22.7 <sup>c</sup>	22.7 <sup>c</sup>
7	21.0 <sup>b</sup>	18.5 <sup>a</sup>	28.6 <sup>a</sup>	27.9 <sup>a</sup>	33.7 <sup>b</sup>	31.3 <sup>a</sup>	23.8 <sup>a</sup>	34.0 <sup>a</sup>	38.3 <sup>b</sup>	73.9 <sup>a</sup>
14	37.3 <sup>a</sup>	20.3 <sup>a</sup>	30.2 <sup>a</sup>	24.4 <sup>c</sup>	46.6 <sup>a</sup>	22.3 <sup>b</sup>	17.0 <sup>a</sup>	17.9 <sup>b</sup>	61.6 <sup>a</sup>	36.2 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	3.0	2.8	2.4	1.3	4.7	2.4	7.3	5.9	3.4	11.4

Los datos son la media de 3 r\u00e9plicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma variedad ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 4.1.A8. Capacidad antioxidante total** ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{g}^{-1}$  PF) de frutos de calabac\u00edn reci\u00e9n cosechados y despu\u00e9s de 7 y 14 d\u00edas a 4 y 20\u00b0C.

Tejido/D\u00edas de almacenamiento	Capea		C\u00f3nsul		Milenio		Natura		Sinatra	
	4\u00b0C	20\u00b0C	4\u00b0C	20\u00b0C	4\u00b0C	20\u00b0C	4\u00b0C	20\u00b0C	4\u00b0C	20\u00b0C
<b>Exocarpo</b>										
0	37.1 <sup>c</sup>	37.1 <sup>c</sup>	26.1 <sup>b</sup>	26.1 <sup>b</sup>	48.5 <sup>c</sup>	48.5 <sup>c</sup>	78.0 <sup>b</sup>	78.0 <sup>ab</sup>	93.6 <sup>b</sup>	93.6 <sup>a</sup>
7	85.8 <sup>b</sup>	42.0 <sup>b</sup>	28.6 <sup>a</sup>	29.7 <sup>a</sup>	55.2 <sup>b</sup>	55.3 <sup>b</sup>	65.4 <sup>c</sup>	80.1 <sup>a</sup>	128.8 <sup>a</sup>	90.3 <sup>a</sup>
14	99.0 <sup>a</sup>	45.9 <sup>a</sup>	30.2 <sup>a</sup>	24.4 <sup>c</sup>	87.2 <sup>a</sup>	75.0 <sup>a</sup>	84.9 <sup>a</sup>	71.1 <sup>b</sup>	134.6 <sup>a</sup>	76.8 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	4.3	1.4	2.4	1.3	5.6	5.3	4.9	7.3	8.5	7.6
<b>Meso y endocarpo</b>										
0	13.8 <sup>b</sup>	13.8 <sup>c</sup>	16.1 <sup>b</sup>	16.1 <sup>b</sup>	16.1 <sup>b</sup>	16.1 <sup>a</sup>	11.8 <sup>c</sup>	11.8 <sup>a</sup>	16.1 <sup>c</sup>	16.1 <sup>c</sup>
7	12.5 <sup>b</sup>	25.4 <sup>a</sup>	19.7 <sup>a</sup>	16.9 <sup>ab</sup>	17.4 <sup>b</sup>	16.0 <sup>a</sup>	14.6 <sup>b</sup>	8.9 <sup>b</sup>	22.7 <sup>b</sup>	23.2 <sup>a</sup>
14	21.3 <sup>a</sup>	20.9 <sup>b</sup>	20.3 <sup>a</sup>	17.2 <sup>a</sup>	20.7 <sup>a</sup>	16.0 <sup>a</sup>	18.4 <sup>a</sup>	12.0 <sup>a</sup>	27.3 <sup>a</sup>	20.0 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	1.8	1.7	1.6	1.0	1.1	1.0	1.3	1.2	2.3	0.8

Los datos son la media de 3 r\u00e9plicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma variedad ( $p < 0.05$ ).



**Tabla 4.1.A9. Fenoles totales** ( $\mu\text{g}$  Ácido gálico  $\text{g}^{-1}$  PF) de frutos de calabacín recién cosechados y después de 7 y 14 días a 4 y 20°C.

Tejido/Días de almacenamiento	<i>Caepa</i>		<i>Cónsul</i>		<i>Milenio</i>		<i>Natura</i>		<i>Sinatra</i>	
	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C
<b>Exocarpo</b>										
0	2.15 <sup>b</sup>	2.15 <sup>c</sup>	3.00 <sup>a</sup>	3.00 <sup>ab</sup>	1.87 <sup>b</sup>	1.87 <sup>c</sup>	2.05 <sup>b</sup>	2.05 <sup>b</sup>	3.83 <sup>b</sup>	3.83 <sup>b</sup>
7	2.87 <sup>a</sup>	2.53 <sup>b</sup>	2.94 <sup>a</sup>	2.70 <sup>b</sup>	1.87 <sup>b</sup>	2.61 <sup>b</sup>	2.02 <sup>b</sup>	2.85 <sup>a</sup>	4.39 <sup>a</sup>	4.80 <sup>a</sup>
14	2.81 <sup>a</sup>	2.78 <sup>a</sup>	2.53 <sup>b</sup>	3.09 <sup>a</sup>	2.88 <sup>a</sup>	3.13 <sup>a</sup>	2.58 <sup>a</sup>	2.73 <sup>a</sup>	4.73 <sup>a</sup>	4.21 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.2	0.22	0.14	0.31	0.21	0.29	0.20	0.23	0.39	0.44
<b>Meso y endocarpo</b>										
0	0.71 <sup>c</sup>	0.71 <sup>b</sup>	1.69 <sup>a</sup>	1.69 <sup>a</sup>	1.50 <sup>b</sup>	1.50 <sup>b</sup>	0.94 <sup>b</sup>	0.94 <sup>b</sup>	1.25 <sup>c</sup>	1.25 <sup>c</sup>
7	0.83 <sup>b</sup>	0.71 <sup>b</sup>	1.48 <sup>b</sup>	1.52 <sup>b</sup>	1.55 <sup>b</sup>	2.09 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>	1.02 <sup>ab</sup>	2.17 <sup>b</sup>	2.30 <sup>a</sup>
14	1.35 <sup>a</sup>	1.14 <sup>a</sup>	1.51 <sup>b</sup>	1.56 <sup>ab</sup>	1.96 <sup>a</sup>	1.78 <sup>c</sup>	1.29 <sup>a</sup>	1.09 <sup>a</sup>	2.84 <sup>a</sup>	2.03 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.10	0.07	0.17	0.13	0.14	0.12	0.15	0.12	0.10	0.10

Los datos son la media de 3 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma variedad ( $p < 0.05$ ).



## *Resultados*

---



## **4.2. CAPÍTULO 2: Estudio de la respuesta al frío en frutos de variedades con distinto grado de tolerancia**

En el capítulo anterior, se han estudiado los cambios que se producen en frutos de calabacín de distintas variedades comerciales como consecuencia de la conservación, dando especial importancia a la respuesta de los mismos frente a bajas temperaturas. Los resultados obtenidos muestran la variabilidad existente y nos han permitido seleccionar entre variedades analizadas aquellas cuyos frutos presentan las respuestas más distantes frente al estrés por frío durante su vida postcosecha. Estas variedades son Natura, variedad con frutos que presentan cierto grado de tolerancia al frío, y Sinatra, una de las variedades con frutos más sensibles a la frigoconservación. En este capítulo, se profundiza en el estudio de las diferencias fisiológicas, bioquímicas y moleculares que presentan los frutos de estas variedades durante su conservación, con objeto de identificar respuestas que puedan formar parte de mecanismos de adaptación y resistencia al estrés o indicadoras de sensibilidad al mismo.

### **2.1. Postcosecha de los frutos Natura y Sinatra**

Los frutos empleados en los distintos ensayos fueron proporcionados por las empresas Mayes Exportación S.L. y Hermanos Femago S.L. Los frutos Natura y Sinatra se almacenaron en cámaras de conservación de la Universidad de Granada a una temperatura controlada de 4 y 20°C durante 7 y 14 días. Frutos de ambas variedades recién cosechados se tomaron como control previo al almacenamiento (tiempo 0). En los ensayos realizados, los frutos no se sometieron a un periodo de aclimatación a temperatura ambiente debido a que el objeto de los mismos era el estudio de los cambios que tienen lugar durante la exposición al estrés por baja temperatura.

#### **a) Aspecto externo**

La apariencia de los frutos analizados se recoge en la Figura 4.2.1. Podemos observar que los frutos de la variedad Natura mantienen su calidad comercial tras el almacenaje a 4°C, sin embargo, los frutos Sinatra pierden gran parte de su valor comercial debido al deterioro de los mismos que produce el frío. Si comparamos el aspecto de estos frutos con los empleados en el capítulo 1 (Páginas 72 y 73, Figuras 4.1.2, 3 y 4), se puede comprobar que el periodo de



aclimatación a temperatura ambiente acentúa los daños sufridos por los frutos almacenados a baja temperatura.

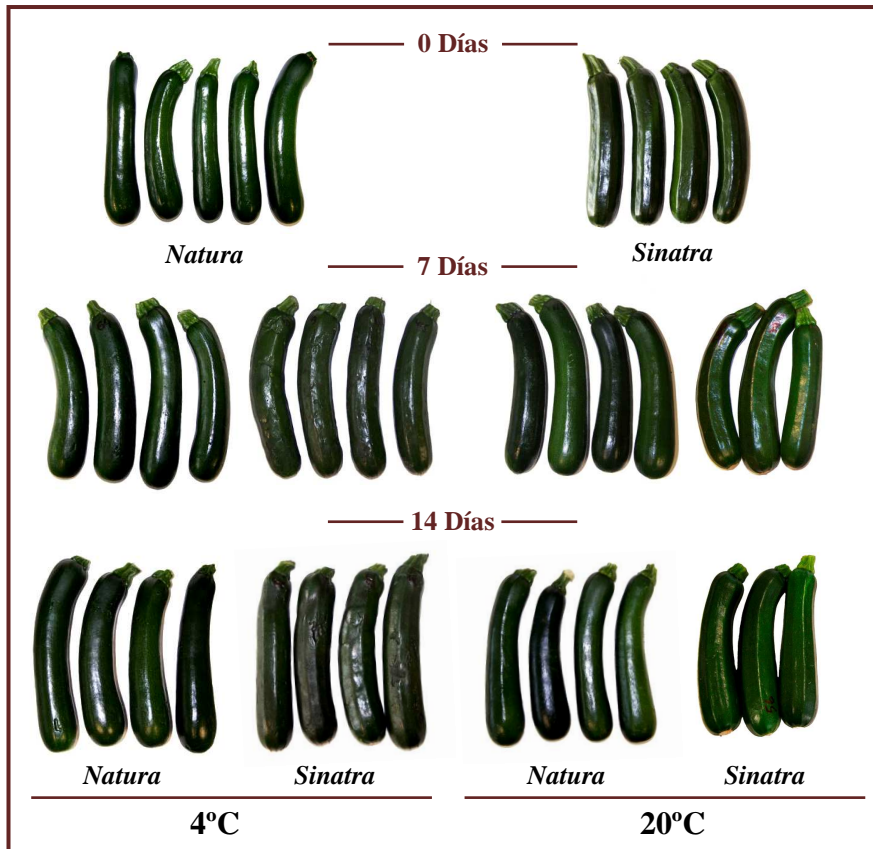


Figura 4.2.1. Aspecto externo de frutos de calabacín de las variedades comerciales Natura y Sinatra recién cosechados y tras 7 y 14 días de almacenamiento a 4 y 20°C.

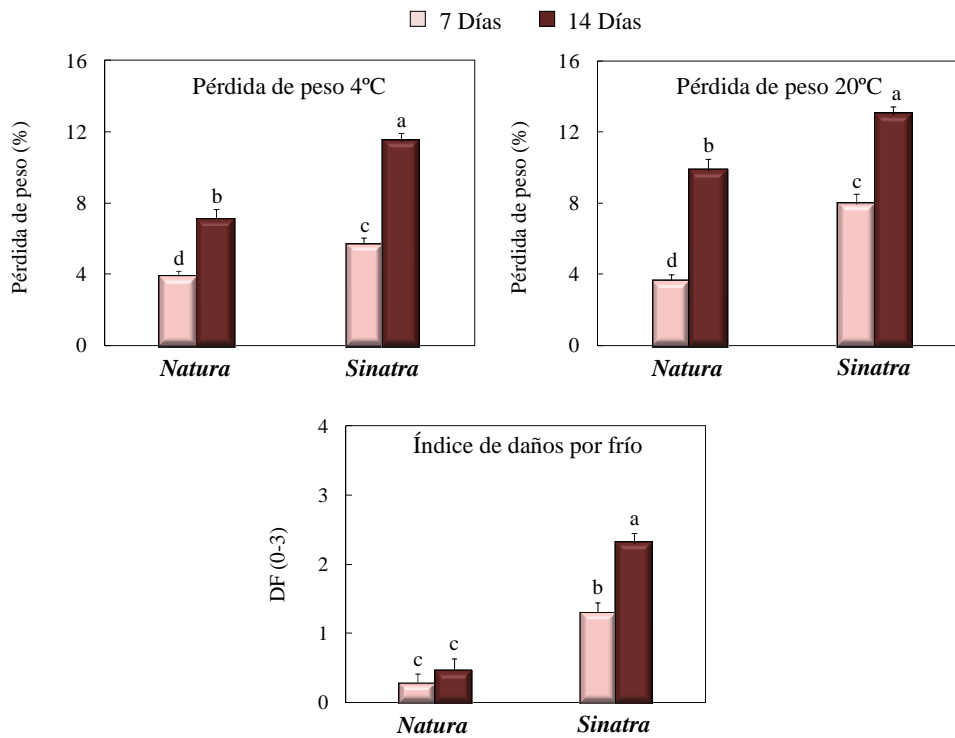
#### b) Pérdida de peso y DF

La Figura 4.2.2 muestra el porcentaje de pérdida de peso y el índice de DF de los frutos de ambas variedades conservados a 4 y 20°C. Al igual que resultó en los frutos aclimatados, la pérdida de peso de los mismos fue significativamente mayor en la variedad Sinatra tanto a 7 como a 14 días de almacenamiento en frío. En ambas variedades la mayor pérdida de peso se dio en el almacenamiento a 20°C. El índice de DF fue significativamente menor en los frutos Natura. Los valores alcanzados en este parámetro son inferiores a los





hallados en los frutos aclimatados (Página 75, Figura 4.1.6) debido a que los cambios que se producen durante la aclimatación acentúan los DF en los frutos.



**Figura 4.2.2.** Porcentaje de pérdida de peso (4 y 20°C) e índice de DF (4°C) en frutos de calabacín Natura y Sinatra conservados 7 y 14 días. Los datos son el valor medio de la muestra (n=18) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

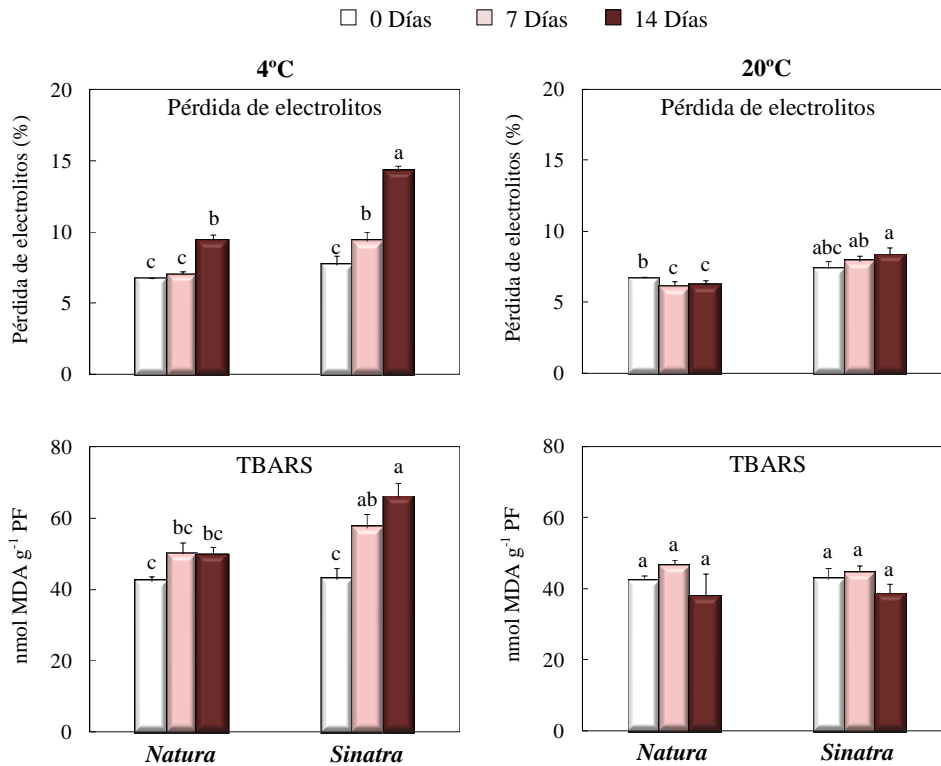
## 2.2. Daños en las membranas en frutos Natura y Sinatra

### a) Pérdida electrolitos y peroxidación de lípidos

En el exocarpo de los frutos conservados a 4 y 20°C, se determinaron la pérdida de electrolitos y la peroxidación lipídica (Figura 4.2.3). La pérdida de electrolitos aumentó en ambas variedades con el almacenamiento a 4°C, siendo el incremento registrado en los frutos Natura de un 40.6% mientras que en los frutos Sinatra, más sensibles al estrés por frío, alcanzó un 86.4%. De igual forma, la peroxidación lipídica aumentó en los frutos conservados a 4°C, siendo



un 32.6% mayor en Sinatra al final del periodo de almacenamiento. Estos parámetros no sufrieron cambios importantes en los frutos mantenidos a 20°C.



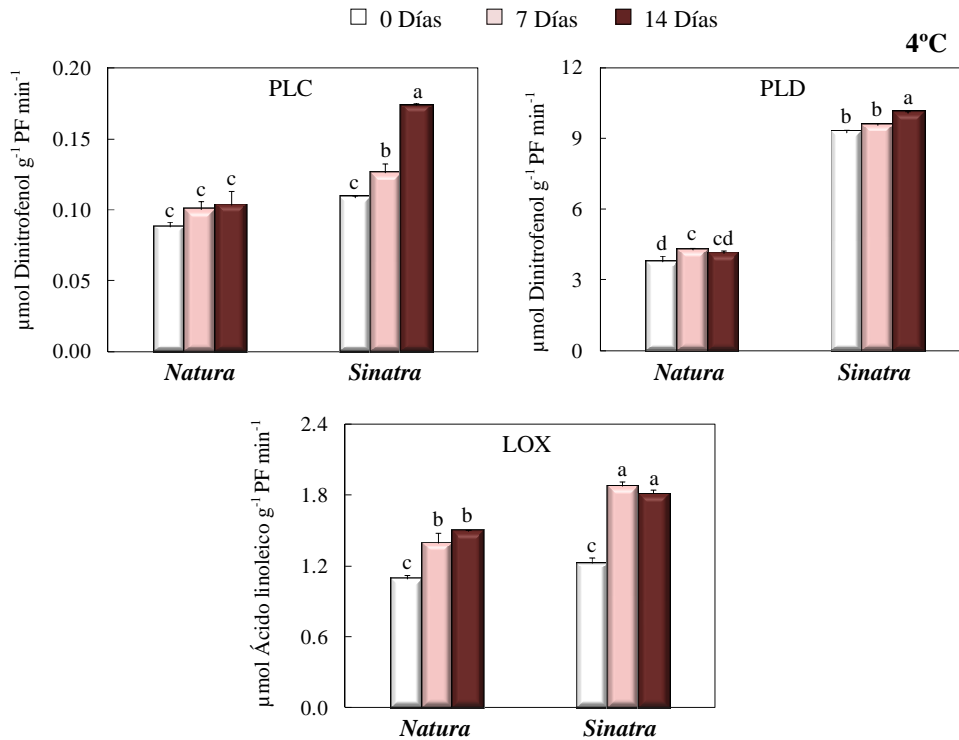
**Figura 4.2.3.** Porcentaje de pérdida de electrolitos y peroxidación lipídica en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra recién cosechados y conservados durante 7 y 14 días a 4 y 20°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=5 y n=3) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### b) Fosfolipasa C, fosfolipasa D y lipoxigenasa

En relación con el metabolismo lipídico, se analizaron las actividades enzimáticas fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD) y lipoxigenasa (LOX), en el exocarpo de los frutos conservados a 4°C y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.2.4. En Sinatra, tanto la actividad PLC como la PLD incrementaron de forma significativa con el almacenamiento en frío, y no se produjo incremento en Natura. La actividad LOX, en cambio, aumentó significativamente en los frutos de ambas variedades, siendo este incremento un



34.6 y un 21.3% superior en el exocarpo de los frutos más sensibles al frío tras 7 y 14 días respectivamente.

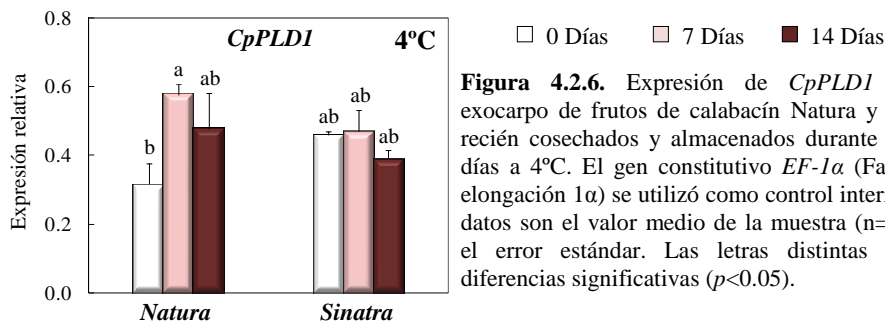
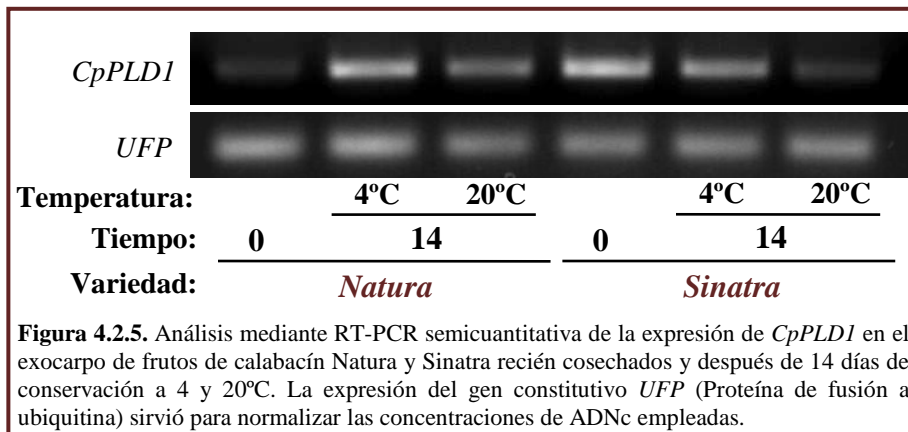


**Figura 4.2.4.** Actividades enzimáticas fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD) y lipoxigenasa (LOX) en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra recién cosechados y después del almacenaje 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Se ha clonado y secuenciado un ADNc parcial de una PLD de calabacín. La secuencia de 651 nucleótidos, denominada *CpPLD1*, se consiguió mediante RT-PCR empleando los cebadores degenerados utilizados por Mao y cols. (2007) para el análisis de la expresión de enzima en frutos de pepino (Tabla 3.5.1 del Material y Métodos, Páginas 60 y 61). La secuencia codifica un péptido de 217 Aa y contiene una región homóloga a la familia PLD que comprende gran parte de la secuencia. Este polipéptido presenta una alta homología con PLD de otras especies de la familia *Cucurbitaceae*, *Cucumis melo* (92% de identidad) y *Cucumis sativus* (91 y 90% de identidad).



El análisis transcripcional de *CpPLDI* se llevó a cabo mediante RT-PCR semicuantitativa (Figura 4.2.5) utilizando los cebadores recogidos en la Tabla 3.5.1 del Material y Métodos (Pág. XX). Se observa un incremento en la expresión de *CpPLDI* tras 14 días de conservación a 4 y 20°C, siendo mayor el aumento en los frutos almacenados en frío. En los frutos Sinatra, en cambio, la mayor acumulación de este ARNm aparece en el exocarpo de los frutos recién cosechados, disminuyendo la expresión al final del periodo de almacenaje, especialmente en los frutos conservados a 20°C. Mediante RT-PCR cuantitativa, se confirman los resultados anteriores. En este caso, se incluyó un tiempo de exposición al frío intermedio (Figura 4.2.6).

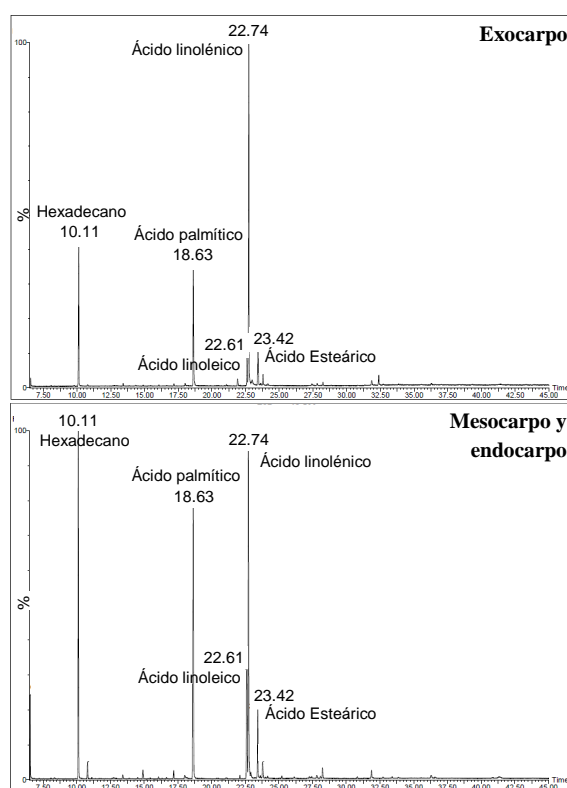


### c) Perfil y contenido de ácidos grasos totales

Para el estudio del perfil de ácidos grasos que presentan los frutos de calabacín, se utilizó tanto el exocarpo como en el mesocarpo y endocarpo de los



frutos de la variedad Sinatra (Figura 4.2.7). En ambos tejidos, se detectaron cuatro ácidos grasos: palmítico (16:0; hexadecanoico), linoleico (18:2; 9,12-octadecadienoico), linolénico (18:3; 12,15-octadecatrienoico) y esteárico (18:0; octadecanoico). El contenido total de ácidos grasos fue mayor en el exocarpo que en el mesocarpo y endocarpo, siendo 6.97 y 1.10 mg g<sup>-1</sup> PF respectivamente. De los cuatro ácidos grasos encontrados, el más abundante en ambos tejidos fue el ácido linolénico.



**Figura 4.2.7.** Cromatogramas del exocarpo y mesocarpo y endocarpo de frutos de calabacín de la variedad Sinatra.

Los cambios cuantitativos en los niveles de ácidos grasos del exocarpo de los frutos Natura y Sinatra debidos al almacenamiento se muestran en la Tabla 4.2.1. La conservación a 20°C, en general, produjo una reducción en el contenido de ácidos grasos en el exocarpo de los frutos de ambas variedades. Tras 14 días de almacenamiento a 4°C, también tuvo lugar una disminución en



los niveles de ácidos grasos exceptuando el ácido linolénico. El contenido de este ácido graso incrementó en el exocarpo de los frutos un 38 y 18% en Natura y Sinatra respecto a los valores iniciales. Aunque los frutos de la variedad Sinatra, más sensible al frío, presentaron unos niveles superiores de este ácido graso, el incremento durante almacenamiento fue mayor en los frutos Natura.

**Tabla 4.2.1.** Diferencias en el contenido en ácidos grasos ( $\text{mg g}^{-1}\text{PF}$ ) en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra.

Variedad/Tiempo Temperatura	Ácidos grasos saturados		Ácidos grasos insaturados	
	Ácido palmítico (16:0)	Ácido esteárico (18:0)	Ácido linoleico (18:2)	Ácido linolénico (18:3)
<b>Natura</b>				
<b>0</b>	1.95 <sup>a</sup>	1.36 <sup>a</sup>	0.39 <sup>b</sup>	2.92 <sup>c</sup>
<b>14</b>	4°C	1.83 <sup>ab</sup>	1.18 <sup>b</sup>	4.03 <sup>b</sup>
	20°C	1.52 <sup>c</sup>	1.12 <sup>b</sup>	0.16 <sup>e</sup>
<b>Sinatra</b>				
<b>0</b>	1.85 <sup>a</sup>	0.47 <sup>c</sup>	0.77 <sup>a</sup>	3.89 <sup>b</sup>
<b>14</b>	4°C	1.57 <sup>bc</sup>	0.32 <sup>cd</sup>	4.62 <sup>a</sup>
	20°C	1.22 <sup>d</sup>	0.40 <sup>c</sup>	0.29 <sup>d</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.27	0.12	0.05	0.44
p-valor	Tiempo	***	***	***
	Variedad	**	***	***
	Temperatura	*	ns	***

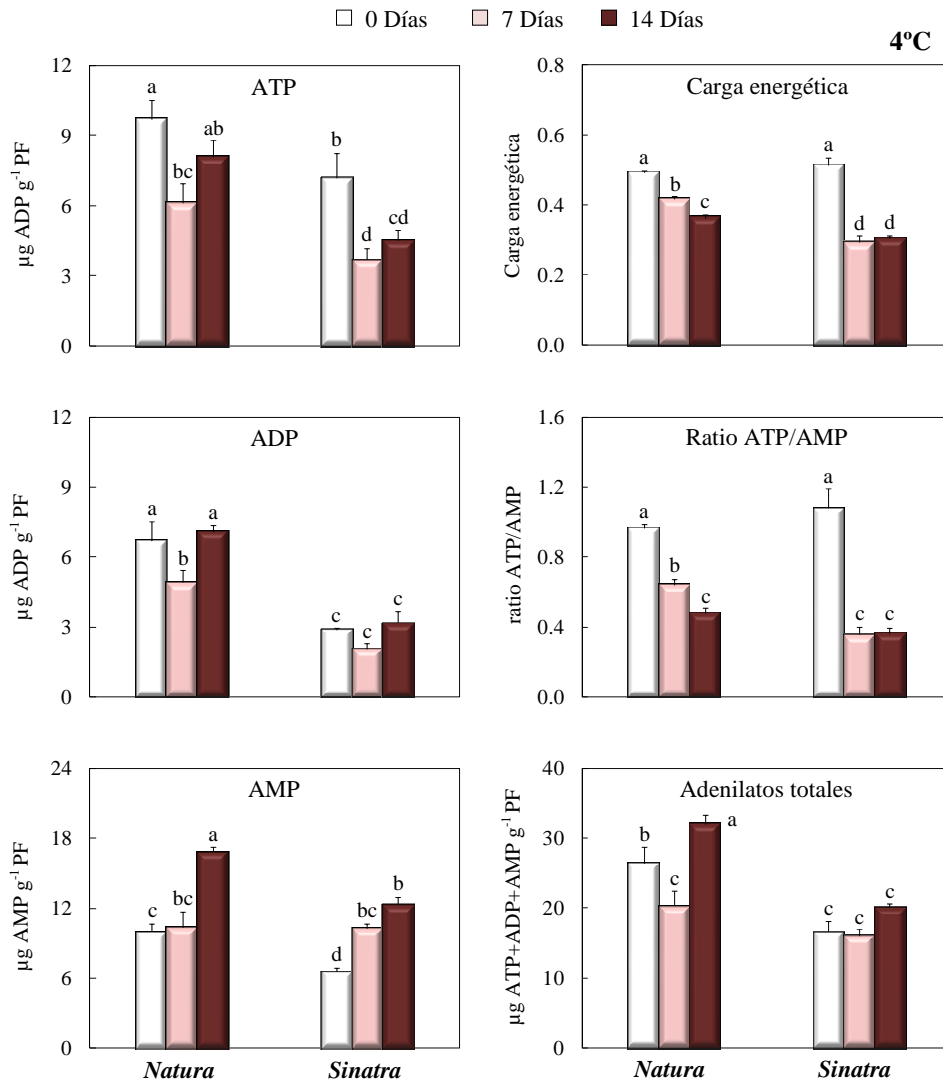
Los datos son la media de 3 réplicas. Valores seguidos por la misma letra en cada columna no difieren significativamente ( $p < 0.05$ ) usando el test MDS. Los niveles de significación están representados por \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y ns (no significativo).

#### d) Estatus energético

Se han medido los niveles de ATP, ADP y AMP en el exocarpo de los frutos Natura y Sinatra. A partir de los valores obtenidos, se calculó la carga energética, la ratio ATP/AMP y el contenido total de adenilatos (Figura 4.2.8). El contenido en ATP del exocarpo disminuyó durante la postcosecha de los frutos de ambas variedades con un incremento en el día 14. En Natura, los frutos presentaron un nivel de ATP superior a los de Sinatra. El ADP mostró una tendencia similar al ATP en la variedad Natura, sin embargo, en Sinatra no cambió significativamente. El contenido en AMP aumentó en ambas variedades, siendo siempre mayor en Natura. Tanto la carga energética como el ratio ATP/AMP disminuyeron con el frío, siempre más en Sinatra, variedad más sensible. El contenido en adenilatos aumentó en los frutos Natura tras el



almacenamiento mientras que en los Sinatra los cambios detectados no fueron significativos.



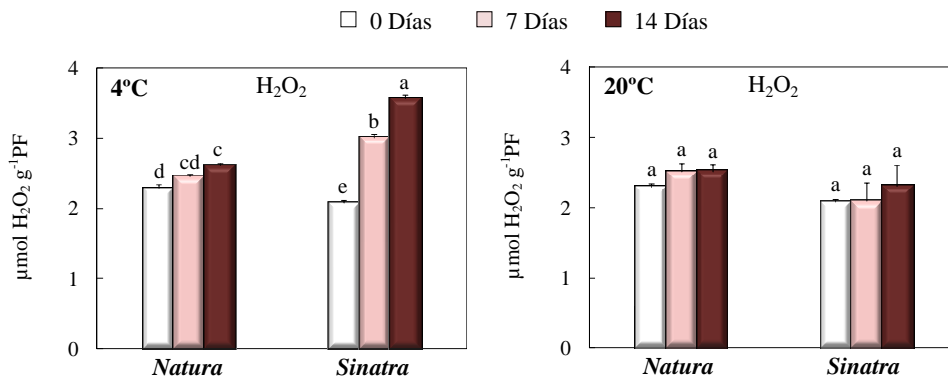
**Figura 4.2.8.** Niveles de ATP, ADP y AMP, carga energética, ratio ATP/AMP y adenilatos totales en el exocarpo de frutos de calabacín de las variedades Natura y Sinatra recién cosechados y tras ser conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).



### 2.3. Metabolismo oxidativo

#### a) Peróxido de hidrógeno

La Figura 4.2.9 refleja los niveles de peróxido de hidrógeno en los frutos Natura y Sinatra conservados a 4 y 20°C. El exocarpo de los frutos almacenados en frío incrementó su contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo este aumento mucho mayor en Sinatra (71.6%) que en Natura (14.1%). En los frutos conservados a 20°C, no se detectaron cambios significativos.

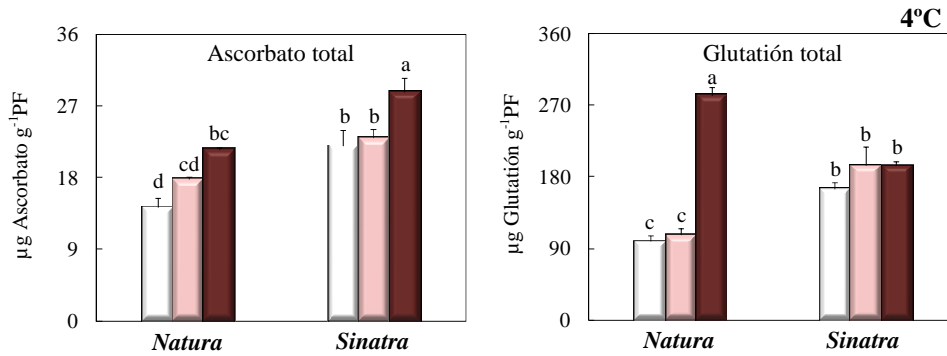


**Figura 4.2.9.** Niveles de peróxido de hidrógeno en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra recién cosechados y tras el almacenamiento durante 7 y 14 días a 4 y 20°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### b) Niveles de ascorbato y glutatión

La Figura 4.2.10 refleja el contenido total de ascorbato y glutatión. El nivel de ascorbato total de los frutos aumentó con el almacenamiento a 4°C en ambas variedades, siendo mayores las concentraciones encontradas en Sinatra. El glutatión total, en cambio, sólo aumentó significativamente en los frutos Natura al final del periodo de conservación en frío.

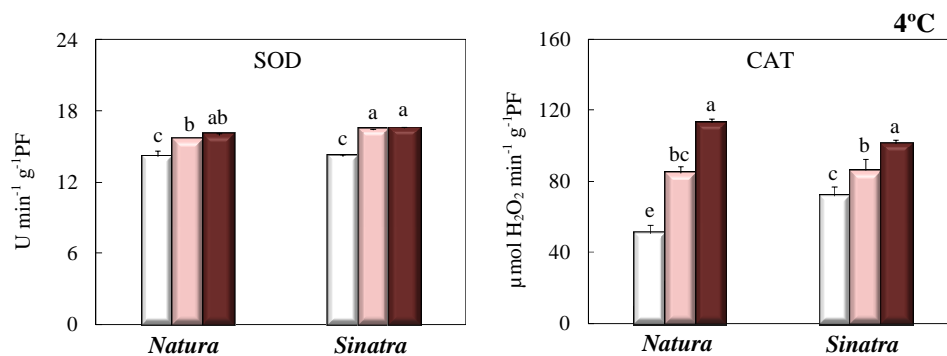




**Figura 4.2.10.** Contenido en ascorbato y glutatión total del exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra recién cosechados y después de 7 y 14 días de conservación a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). □ 0 Días □ 7 Días ■ 14 Días.

### c) Superóxido dismutasa y catalasa

Las actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) se recogen en la Figura 4.2.11. Tanto en el exocarpo de los frutos Natura como Sinatra, ambas enzimas aumentaron con el almacenamiento a 4°C. Mientras que la actividad SOD incrementó más en los frutos Sinatra, la CAT aumentó más en Natura.

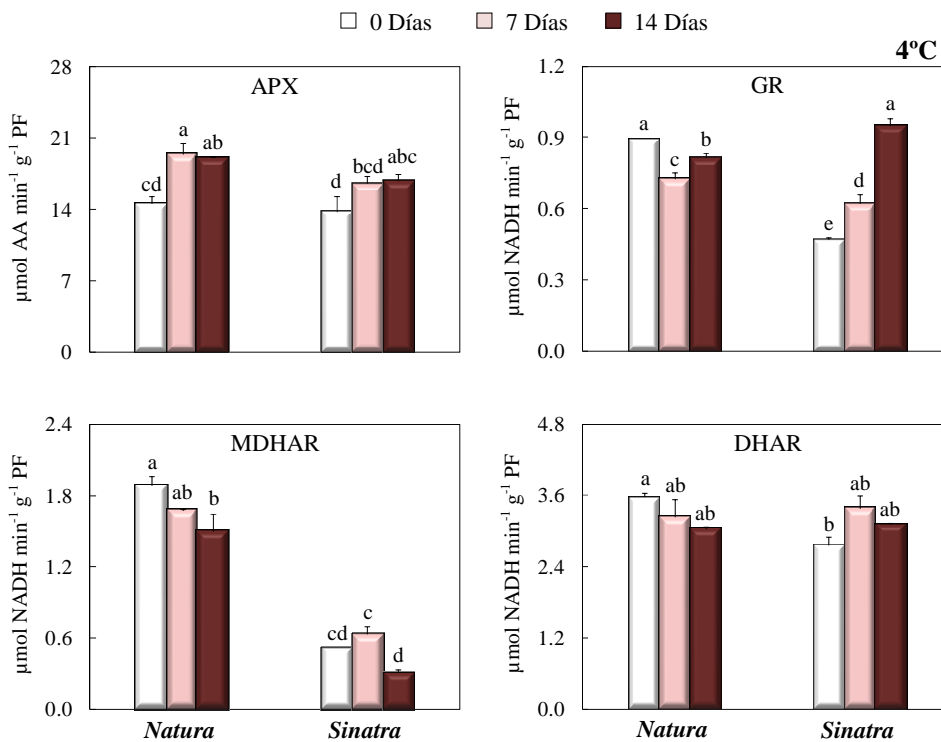


**Figura 4.2.11.** Actividades superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra conservados 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). □ 0 Días □ 7 Días ■ 14 Días.



#### d) Enzimas del ciclo ascorbato-glutatión

En la Figura 4.2.12 se representan los resultados obtenidos en las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión. La actividad enzimática ascorbato peroxidasa (APX) aumentó más en los frutos Natura que en Sinatra con la conservación. Las actividades glutatión reductasa (GR), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) y deshidroascorbato reductasa (DHAR) disminuyeron con el almacenamiento a 4°C en Natura. En Sinatra, la actividad GR aumentó de forma significativa con el tiempo en frío, mientras que las enzimas MDHAR y DHAR presentaron un incremento a los 7 días y una disminución a los 14. Destaca la alta actividad MDHAR inicial encontrada en Natura.

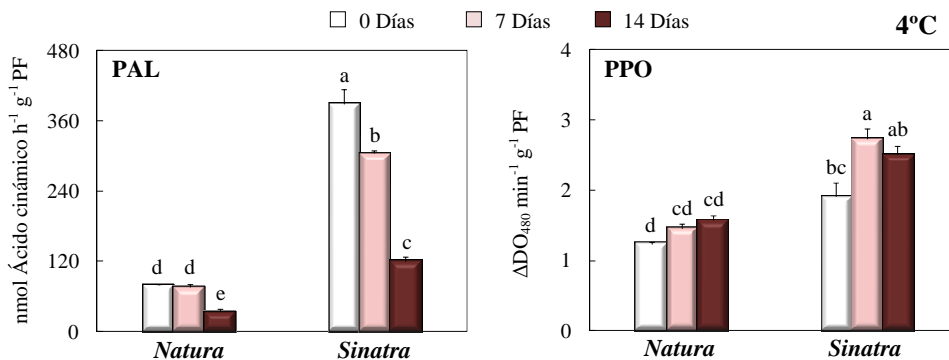


**Figura 4.2.12.** Actividades enzimáticas ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) y deshidroascorbato reductasa (DHAR) en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra recién cosechados y tras ser conservados 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). AA=ascorbato.



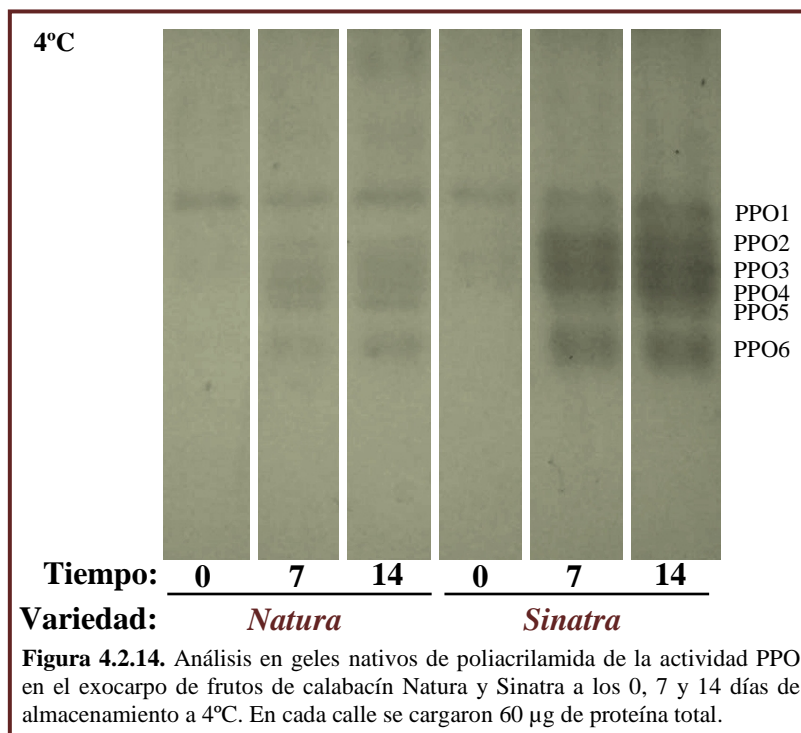
### e) Fenilalanina amonio-liasa y polifenol oxidasa

Las actividades enzimáticas fenilalanina amonio-liasa (PAL) y polifenol oxidasa (PPO) se muestran en la Figura 4.2.13. La actividad PAL disminuyó a lo largo de la conservación en frío tanto en Natura como en Sinatra. Los frutos de la variedad más sensible presentaron niveles de actividad PAL superiores a los de Natura, sin embargo, la disminución que se produce con la conservación es mayor. La actividad PPO aumentó de forma significativa con en el exocarpo de los frutos Sinatra almacenados en frío.



**Figura 4.2.13.** Actividades fenilalanina amonio-liasa (PAL) y polifenol oxidasa (PPO) en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra recién cosechados y conservados 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La actividad enzimática PPO también fue determinada en geles nativos de poli(acrilamida) para diferenciar posibles cambios en sus isoformas (Figura 4.2.14). En los frutos recién cosechados, sólo se pudo distinguir con claridad una banda. A los 7 y 14 días en frío, el exocarpo de los frutos presentó 6 bandas reactivas, teniendo más actividad en el exocarpo de los frutos de la variedad Sinatra, coincidiendo con los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad *in vitro*.



#### f) Análisis de expresión

Junto al análisis fisiológico, se ha realizado un estudio transcripcional de la regulación del metabolismo oxidativo. Se han utilizado algunas secuencias disponibles en las bases de datos, así como otras obtenidas en nuestro laboratorio para este objetivo. Para estos estudios se ha utilizado la técnica de RT-PCR semicuantitativa, los ADNc analizados han sido los de ascorbato peroxidasa (*APXI*), catalasa (*CAT1*, 2 y 3) fenilalanina amonio-liasas (*PAL1*), oxidasa alternativa (*AOX*), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PDH*), y las enzimas málico dependientes de  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  (*NAD-ME* y *NADP-ME*). Algunos de ellos corresponden a enzimas cuya actividad ha sido cuantificada, mientras que otros codifican otras enzimas relacionadas con la defensa antioxidante bien porque formen parte de mecanismos enzimáticos para evitar la generación de ROS, como es el caso de la *AOX*, o porque catalicen reacciones en las que se genera poder reductor necesario para algunas de las



reacciones de detoxificación, como son G6PDH, NAD- y NADP-ME. De estas secuencias, se han obtenido en nuestro laboratorio *CpAPXI* y *CpPALI*. Se trata de dos secuencias parciales obtenidas mediante RT-PCR empleando como molde ADNc procedente de ARN total de exocarpo de frutos de calabacín.

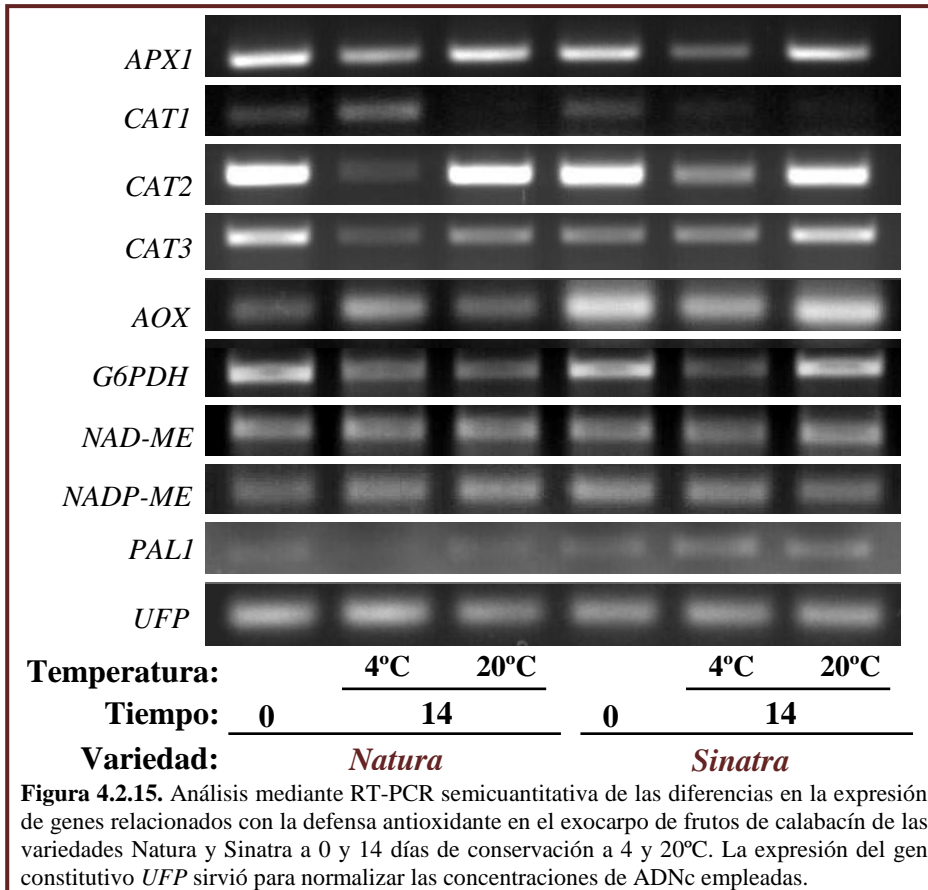
En el caso de *CpAPXI* (Nº Acceso KF954415), se utilizaron cebadores específicos diseñados frente a regiones conservadas de la secuencia de una APX de fruto de pepino (Nº Acceso HQ446098). El fragmento obtenido contiene 430 y codifica un polipéptido de 116 Aa, que forma parte de un dominio homólogo al de la familia peroxidasa con un sitio de unión al grupo hemo. El análisis de este polipéptido revela una alta homología con APXs de otras Cucurbitáceas como *Cucurbita maxima* (99% de identidad con *APXI* y 96% con *APX2*), *Cucurbita moschata* (99% de identidad con *APXI* y 96% con *APX2*), *Cucumis sativus* (97, 96, 95, 94 y 93% de identidad con las distintas secuencias APX de esta especie disponibles) y *Momordica charantia* (95% de identidad).

Para la obtención de *CpPALI* se usaron cebadores degenerados diseñados frente a regiones conservadas de las distintas secuencias PAL de pepino analizadas por Shang y cols. (2012). La secuencia parcial obtenida está formada por 668 nucleótidos y codifica un polipéptido de 153 Aa. La secuencia aminoacídica presenta un dominio conservado en la superfamilia liasa. El polipéptido codificado por *CpPALI* presenta una alta homología con secuencias proteicas PALs de distintas especies como son *Cucumis sativus* L. (95, 94 y 93% de identidad), *Morus alba* L. (92% de identidad) y *Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai (91% de identidad).

Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de estos genes mediante RT-PCR semicuantitativa se recogen en la Figura 4.2.15. Los cebadores empleados se recogen en la Tabla 3.5.1 del Material y Métodos (Pág. 60). La expresión de *APXI*, *CAT2*, *G6PDH*, *NAD* y *NADP-ME* mostró la misma tendencia en los frutos de ambas variedades. *APXI*, *CAT2* y *G6PDH* disminuyeron su expresión con el almacenamiento en frío, mientras que *NAD* y *NADP-ME* no presentaron cambios respecto a los niveles iniciales de expresión. La acumulación de ARN mensajeros de *CAT1* y *AOX* disminuyó en los frutos conservados a 20°C de ambas variedades, sin embargo, a 4°C, sólo se detectó un aumento en los frutos Natura. La expresión de *CAT3* disminuyó en Natura con el frío mientras que en Sinatra no presentó cambios a 4°C. En el caso de *PALI*,



los frutos Natura mostraron una expresión muy baja, no detectándose tras 14 días a 4°C. En Sinatra, encontramos mayor expresión pero no se encontraron diferencias con la conservación.



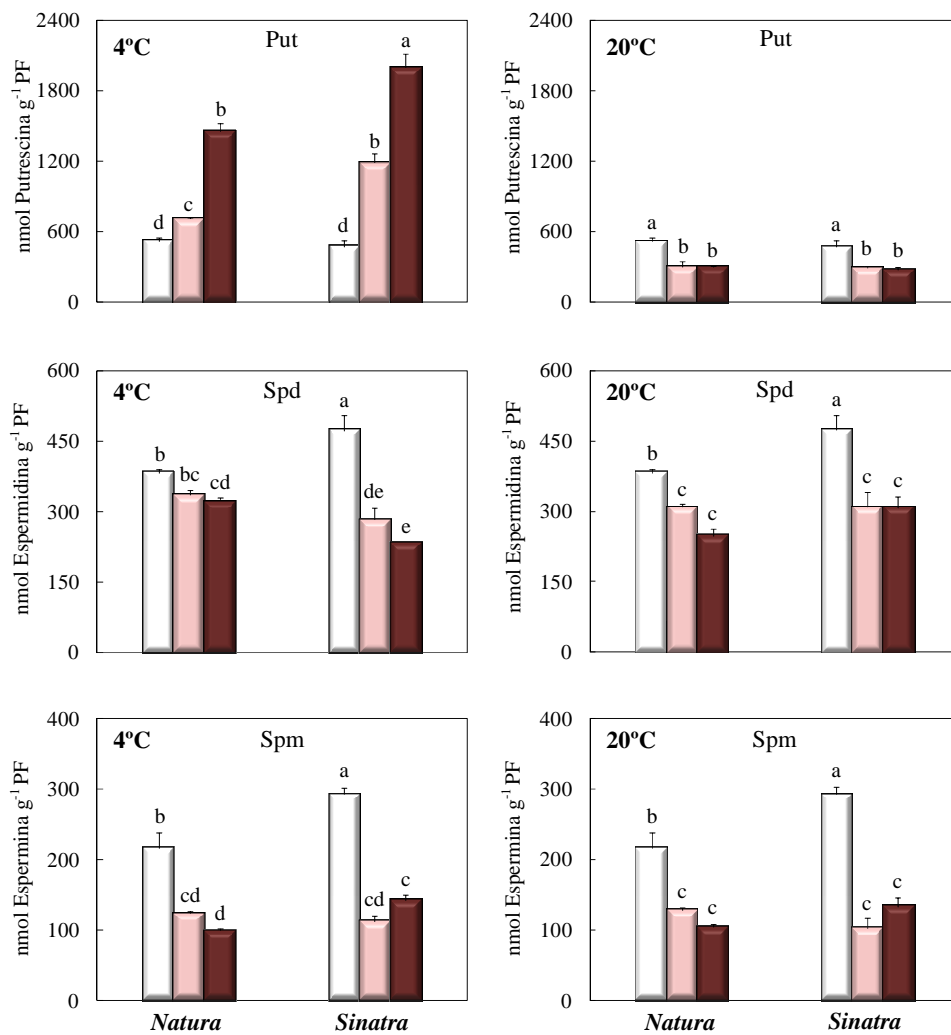
## 2.4. Reguladores del crecimiento y metabolitos relacionados con el estrés

### a) Poliaminas

Se estudiaron los cambios en el contenido en poliaminas (PAs) de los frutos Natura y Sinatra conservados a 4 y 20°C (Figura 4.2.16). En el exocarpo de los frutos se han detectado las PAs putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm). La Put fue la única que aumentó durante el almacenamiento de los frutos a 4°C. Este incremento fue significativamente mayor en los frutos Sinatra, más sensibles al estrés por frío. A 20°C, en cambio, los niveles de esta



poliamina bajaron en las dos variedades. El contenido en las poliaminas espermidina y espermina se redujo durante el almacenamiento de los frutos, tanto a 4 como a 20°C, siendo la disminución mayor en los frutos más sensibles.

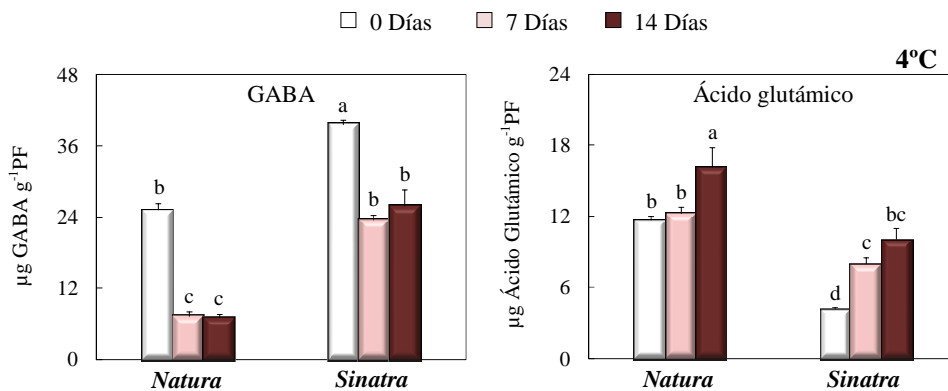


**Figura 4.2.16.** Niveles de las poliaminas putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra recién cosechados y tras 7 y 14 días a 4 y 20°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). □ 0 Días □ 7 Días ■ 14 Días.



### b) Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y ácido glutámico

La Figura 4.2.17 recoge los datos resultantes de la cuantificación de los ácidos  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y glutámico en los frutos almacenados a 4°C. El contenido en GABA disminuyó con el frío en ambas variedades, presentando Natura niveles inferiores a Sinatra. La tendencia del glutámico fue opuesta, incrementando con el almacenaje a 4°C y siendo mayor en los frutos Natura que en Sinatra.

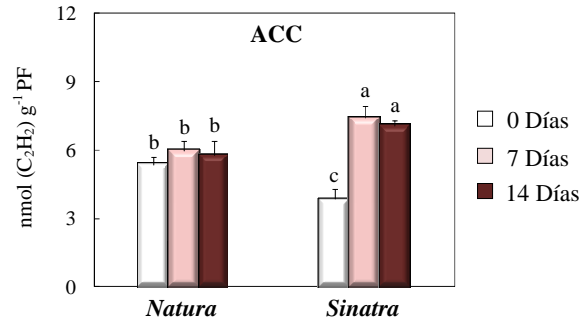


**Figura 4.2.17.** Niveles de los ácidos  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y glutámico en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra conservados 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra ( $n=3$ ) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

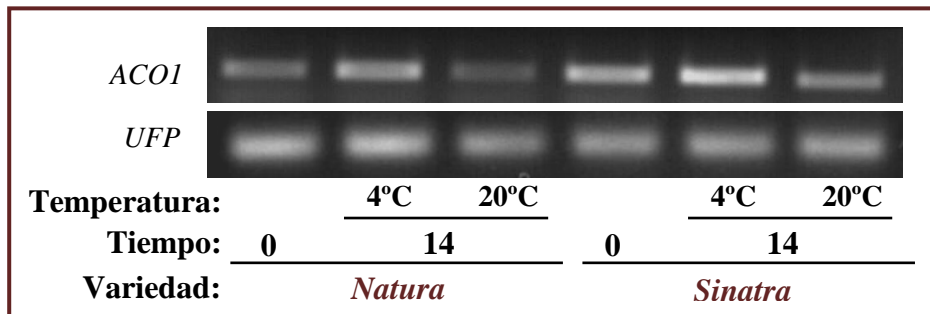
### c) ACC y expresión ACC oxidasa

El contenido en ACC aumentó con el almacenamiento en frío de los frutos Natura y Sinatra, siendo mayores los niveles alcanzados en los frutos de la variedad sensible (Figura 4.2.18). La Figura 4.2.19 muestra el análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa del gen *CpACO1* (Nº Acceso HQ847860) cuya secuencia fue obtenida en nuestro laboratorio. En ambas variedades, la expresión de *CpACO1* aumentó en los frutos conservados a 14 días a 4°C, mientras que en los almacenados a 20°C se produjo una disminución. La expresión fue mayor en los frutos Sinatra, más sensibles al frío.





**Figura 4.2.18.** Expresión de *CpPLD1* en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra recién cosechados y almacenados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos son el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



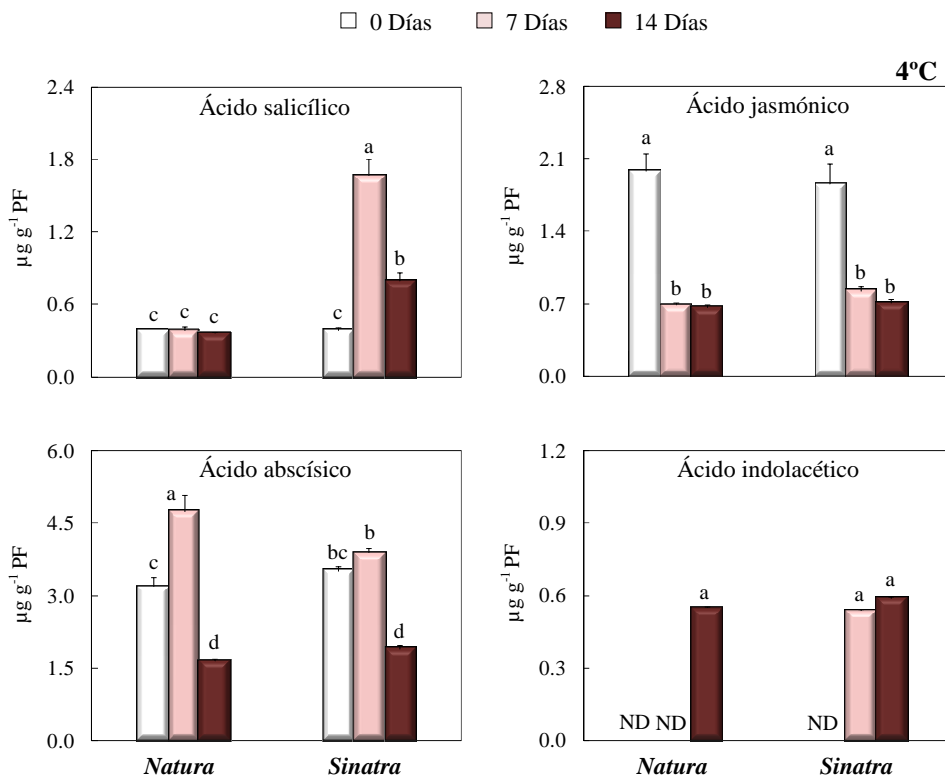
**Figura 4.2.19.** Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa de la expresión de *CpACO1* en el exocarpo de frutos de calabacín de las variedades Natura y Sinatra a 0 y 14 días de conservación a 4 y 20°C. La expresión del gen constitutivo *UFP* sirvió para normalizar las concentraciones de ADNc empleadas.

#### d) Otras fitohormonas

La Figura 4.2.20 recoge los resultados de la cuantificación de los ácidos salicílico (AS), jasmónico (AJ), abscísico (ABA) e indolacético (AIA) en el exocarpo de los frutos Natura y Sinatra conservados a 4°C. Mientras que en Natura las cantidades de AS no cambian durante la frigoconservación, en Sinatrase aprecia un incremento muy significativo, mayor a los 7 días en frío. Tanto el nivel como la tendencia mostrada por el AJ fueron similares en ambas variedades, disminuyendo con el tiempo de almacenamiento en frío. El ABA aumentó a los 7 días de almacenaje un 45% en frutos de Natura, mientras que



en Sinatra el aumento sólo fue de un 10%. A los 14 días en frío, se detectó una bajada drástica en el contenido en ABA tanto en Natura como en Sinatra. Los niveles de AIA no fueron detectables en los frutos recién cosechados, y se incrementa con el tiempo de conservación; tras 7 días a 4°C se acumula AIA en los frutos Sinatra y a los 14 se mantienen en Sinatra y se acumulan en Natura.



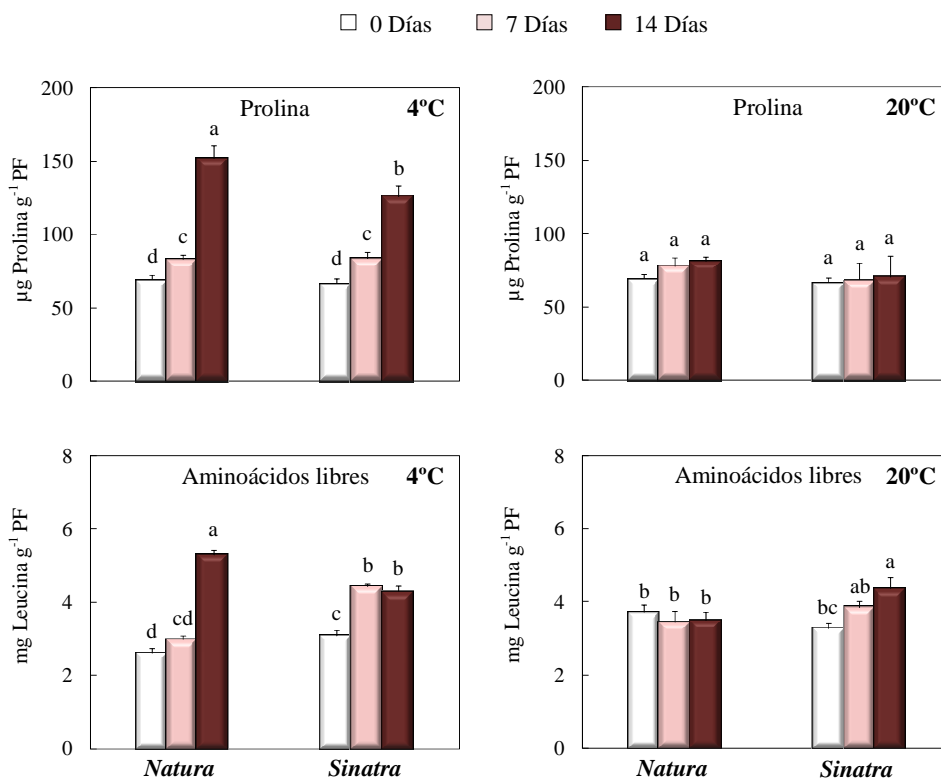
**Figura 4.2.20.** Contenido en los ácidos salicílico (AS), jasmónico (AJ), abscísico (ABA) e indolacético (AIA) del exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ). ND=no detectado.

### e) Prolina y aminoácidos libres totales

Se cuantificó el contenido en prolina (Pro) y aminoácidos (Aa) libres totales del exocarpo de los frutos Natura y Sinatra y los resultados se recogen en la Figura 4.2.21. En los frutos de ambas variedades aumentan los niveles de prolina con el almacenaje a 4°C, presentando Natura un contenido mayor al



final del periodo de conservación. A 20°C, los niveles de prolina del exocarpo de los frutos no presentaron cambios durante el periodo de almacenamiento. El contenido en Aa aumentó en los frutos tanto a 4°C como a 20°C de una forma similar a los resultados encontrados para prolina. En los frutos conservados a 20°C, sólo en el exocarpo de Sinatra se detectó un incremento de Aa.

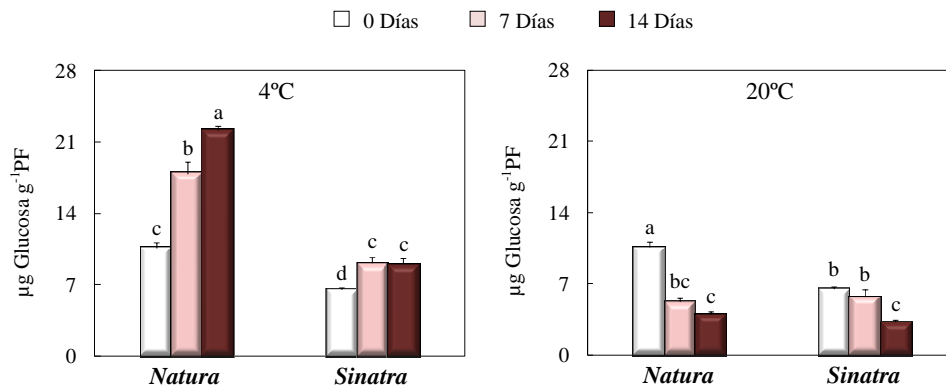


**Figura 4.2.21.** Contenido en prolina y aminoácidos libres totales en el exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4 y 20°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



### f) Azúcares solubles totales

Se analizaron los cambios en el nivel de azúcares solubles totales en el exocarpo (Figura 4.2.22). Durante la conservación en frío, aumentó el contenido en azúcares solubles totales, duplicándose los niveles de los mismos en el exocarpo de la variedad más tolerante al frío al final del periodo de conservación. A 20°C, los azúcares solubles totales disminuyeron en los frutos de las dos variedades estudiadas.



**Figura 4.2.22.** Diferencias en el contenido en azúcares solubles totales del exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra conservados 7 y 14 días a 4 y 20°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



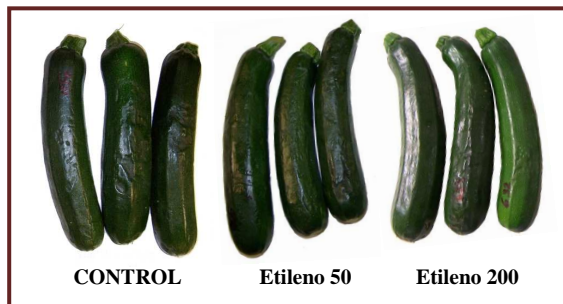
### 4.3. CAPÍTULO 3: Selección de tratamientos postcosecha para la mejora de la frigoconservación de los frutos de calabacín

El objeto del presente capítulo ha sido estudiar el efecto de diversos tratamientos que, aplicados tras la cosecha y antes del almacenamiento de los frutos, puedan influir positivamente a la adquisición de tolerancia a su almacenamiento en frío. Entre los tratamientos químicos realizados se incluye la aplicación exógena de algunos reguladores del crecimiento, o el uso de inhibidores de algunas hormonas, mientras que los tratamientos físicos han sido tratamientos térmicos y de preacondicionamiento. Se han utilizado distintas variedades comerciales cuyos frutos difieren en su grado de sensibilidad al estrés por baja temperatura.

#### 4.3.1. Efecto de distintos tratamientos químicos sobre la postcosecha de los frutos de calabacín

##### a) Etileno

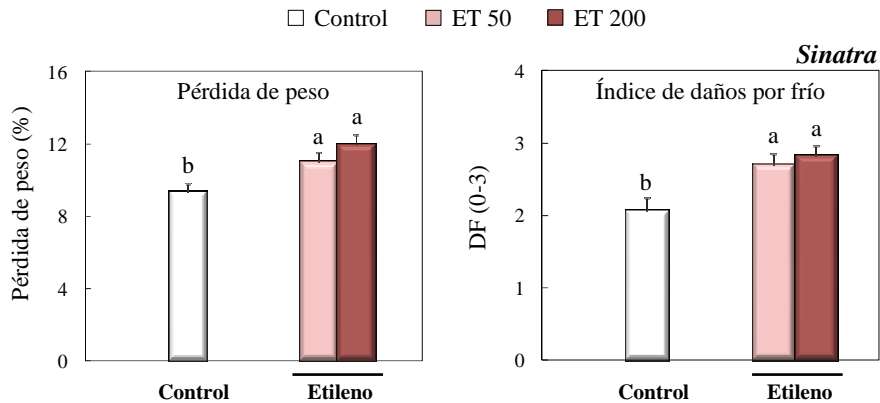
Se aplicaron dos dosis de etileno, de 50 y 200  $\mu\text{L L}^{-1}$ , sobre frutos recién cosechados de la variedad Sinatra. La Figura 4.3.1 muestra la **apariencia externa** de los frutos control y tratados con etileno después de 14 días de almacenamiento a 4°C. Ambos tratamientos de etileno empeoraron la respuesta al frío de los frutos, haciendo que éstos perdieran su valor comercial.



**Figura 4.3.1.** Efecto de la aplicación de etileno a distinta concentraciones antes de la conservación en frío sobre el aspecto externo de frutos de calabacín de la variedad Sinatra tras de 14 días de almacenamiento a 4°C.



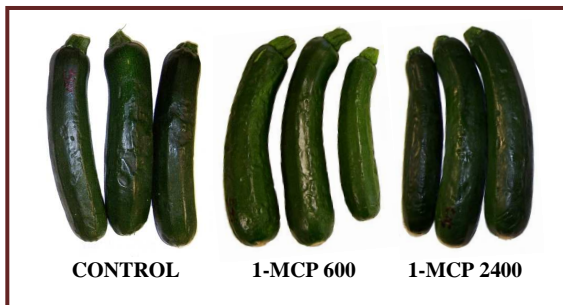
La **pérdida de peso** y los **daños por frío** se recogen en la Figura 4.3.2. Los tratamientos con etileno aumentaron tanto la pérdida de peso como el índice de daños por frío de los frutos después de 14 días en frío.



**Figura 4.3.2.** Efecto de los tratamientos con etileno (ET) sobre la pérdida de peso y el índice de DF en frutos de calabacín de la variedad Sinatra conservados 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=15) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p<0.05$ ).

### b) 1-MCP

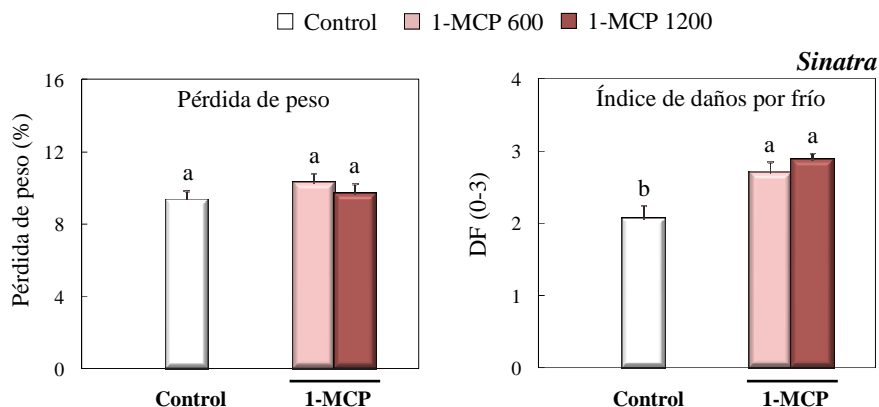
La Figura 4.3.3 muestra el **aspecto externo** de los frutos de la variedad Sinatra tratados con 600 y 2400 nL L<sup>-1</sup> de 1-MCP. Al igual que en el caso del etileno, ambos tratamientos empeoraron la apariencia de los frutos respecto a su control.



**Figura 4.3.3.** Efecto de la aplicación de 1-MCP a distinta concentraciones antes de la conservación en frío sobre el aspecto externo de frutos de la variedad Sinatra tras de 14 días de almacenamiento a 4°C.



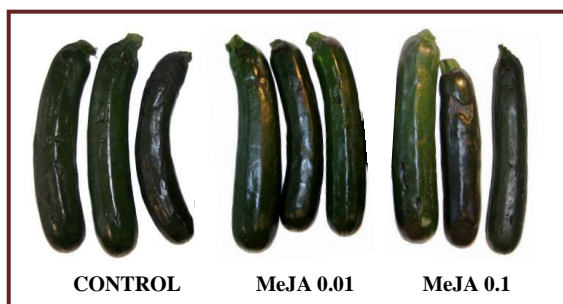
La **pérdida de peso** y los **daños por frío** de los frutos se recogen en la Figura 4.3.4. El 1-MCP no produjo cambios en el porcentaje de pérdida de peso de los frutos, sin embargo, aumentó el índice de años por frío.



**Figura 4.3.4.** Efecto de los tratamientos con 1-MCP sobre la pérdida de peso y el índice de DF en frutos de calabacín de la variedad Sinatra conservados 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=15) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

### c) Jasmonato de metilo

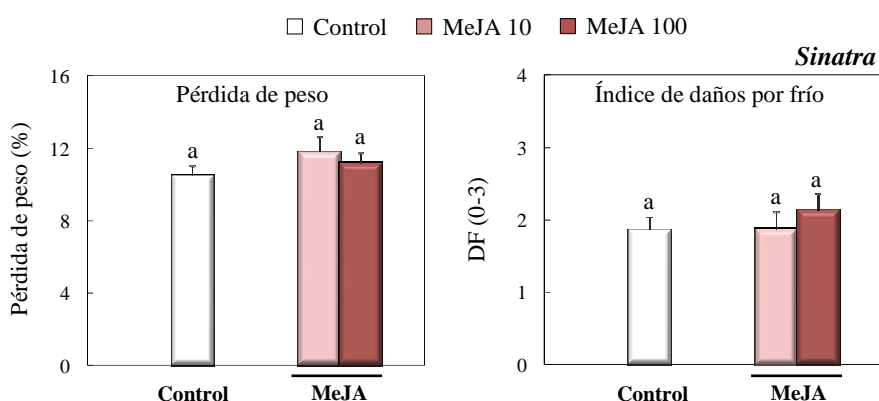
Se aplicaron dos dosis de jasmonato de metilo, 0.01 y 0.1 mM, a un conjunto de frutos de la variedad Sinatra. La **aparición externa** de los frutos tras 14 días a 4°C se presenta en la Figura 4.3.5. Las dos dosis de jasmonato de metilo empleadas no mejoraron el aspecto de los frutos después de 14 días en frío.



**Figura 4.3.5.** Efecto de la aplicación de jasmonato de metilo (MeJA) a distintas concentraciones antes del almacenaje en frío sobre el aspecto externo de frutos de calabacín de la variedad Sinatra tras de 14 días a 4°C.



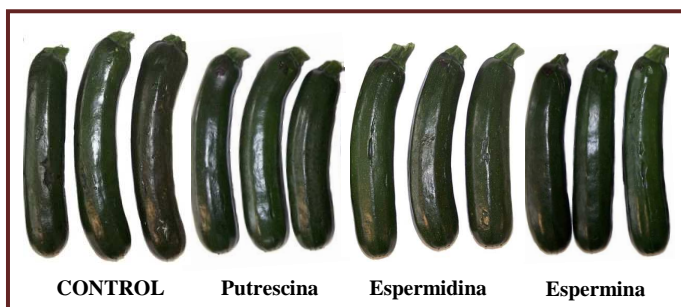
Esta fitohormona tampoco produjo cambios en el porcentaje de **pérdida de peso** ni en el **índice de DF** si comparamos con los resultados obtenidos en los frutos control (Figura 4.3.6).



**Figura 4.3.6.** Efecto de los tratamientos con jasmonato de metilo (MeJA) sobre la pérdida de peso y el índice de DF en frutos de calabacín de la variedad Sinatra conservados 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=15) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p<0.05$ ).

#### d) Poliaminas

Los tratamientos se aplicando 1 mM de putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) a frutos de la variedad Sinatra. La Figura 4.3.7 muestra la **aparición externa** de los frutos control y tratados después de 14 días a 4°C. Las tres poliaminas utilizadas mejoraron el aspecto externo de los frutos respecto a su control, siendo mayores las diferencias encontradas cuando se aplicó putrescina.

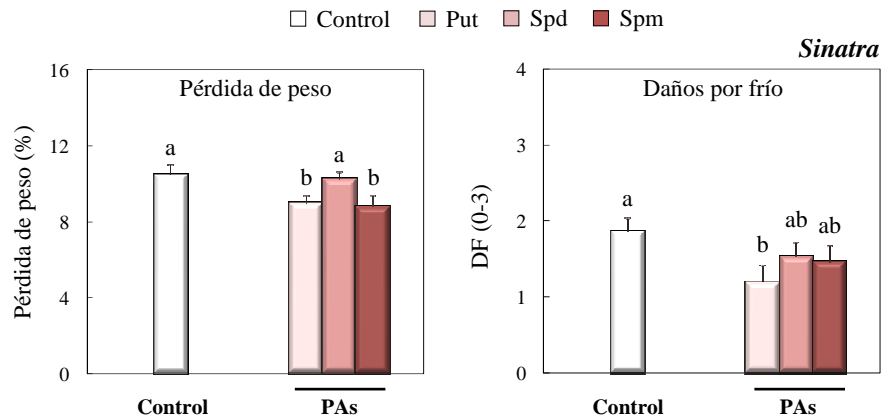


**Figura 4.3.7.** Efecto de la aplicación de putrescina, espermidina y espermina antes de la conservación en frío sobre el aspecto externo de frutos de la variedad Sinatra tras de 14 4°C.





La aplicación exógena de Put y Spm redujo la **pérdida de peso** mientras que solo la putrescina disminuyó significativamente los **daños por frío** de los frutos (Figura 4.3.8).



**Figura 4.3.8.** Efecto de los tratamientos con las poliaminas (PAs) putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) sobre la pérdida de peso y los daños por frío en frutos de calabacín de la variedad Sinatra conservados 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=15) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

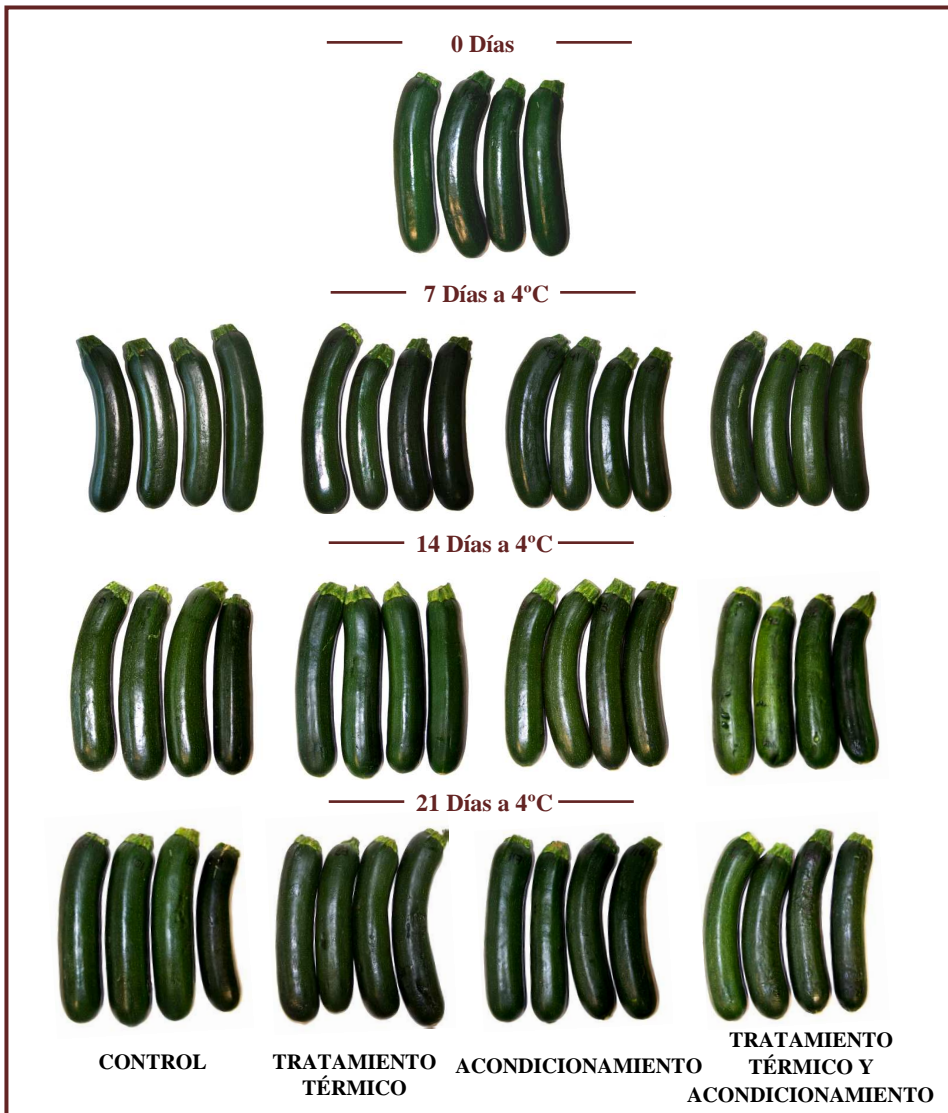
#### 4.3.2. Efecto de distintos tratamientos físicos sobre la postcosecha de los frutos de calabacín

Se llevaron a cabo dos ensayos en los que se aplicaron tratamientos basados en cambios de temperatura. En el primero, se utilizaron frutos de las variedades comerciales Diamante y Milenio. A estos frutos se les aplicó un tratamiento térmico consistente en inmersión en agua a 42°C durante 30 min o un preacondicionamiento 15°C 48 h. Después de los tratamientos, los frutos se conservaron a 4°C y sus efectos fueron evaluados tras 14 días en frío. El segundo ensayo, se llevó a cabo con frutos de la variedad Natura a los que se aplicaron 3 tratamientos distintos, uno de 30 min a 42°C, otro de 15°C durante 48 h y otro que era la combinación de los dos primeros (42°C 30 min seguido de 15°C durante 48 h). El efecto de los mismos fue evaluado a los 7, 14 y 21 días



de conservación en frío, aunque los datos que se muestran son los correspondientes al día 14.

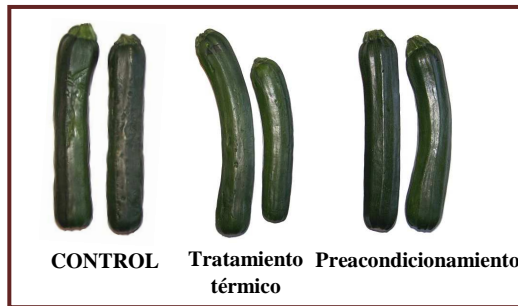
a) Aspecto externo



**Figura 4.3.9.** Efecto de distintos tratamientos previos a la conservación en frío sobre el aspecto externo de frutos de calabacín de la variedad comercial Natura después de 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 4°C.

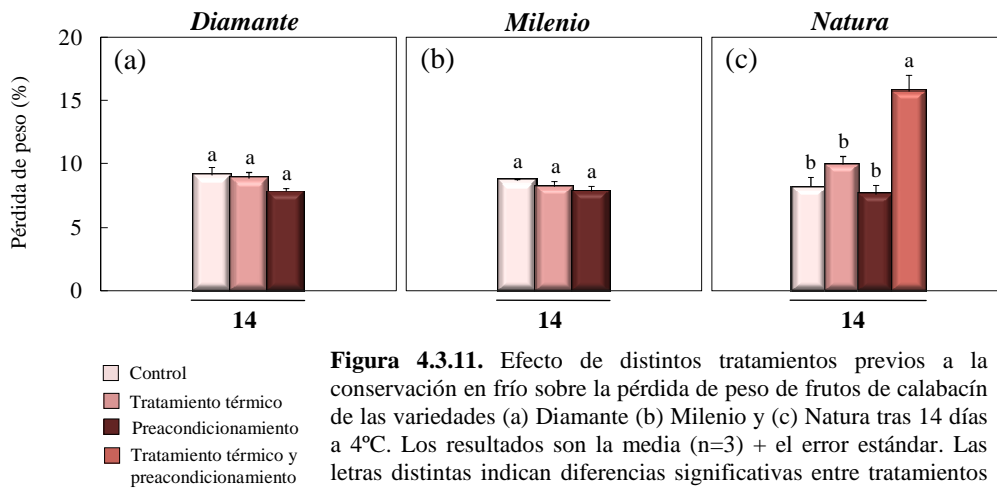


Las Figuras 4.3.9 y 10 muestran el **aspecto externo** de los frutos de Natura y Milenio empleados en estos ensayos. En la variedad Natura, debido a su mayor tolerancia al frío, encontramos menos diferencias entre los frutos tratados y su control. A pesar de ello, podemos ver que el preacondicionamiento mejora la apariencia externa de los frutos mientras que el tratamiento combinado hace que los frutos pierdan calidad comercial. En cambio, las diferencias encontradas en los frutos de Milenio tratados son mayores respecto a su control por tratarse de frutos con más sensibles al frío. Los cambios producidos en la apariencia de los frutos de la variedad Diamante fueron similares a los mostrados para los frutos de Milenio.



**Figura 4.3.10.** Efecto de la aplicación previa al almacenaje de un tratamiento térmico y de un preacondicionamiento sobre el aspecto externo de frutos de la variedad Milenio tras 14 días a 4°C.

**b) Pérdida de peso**



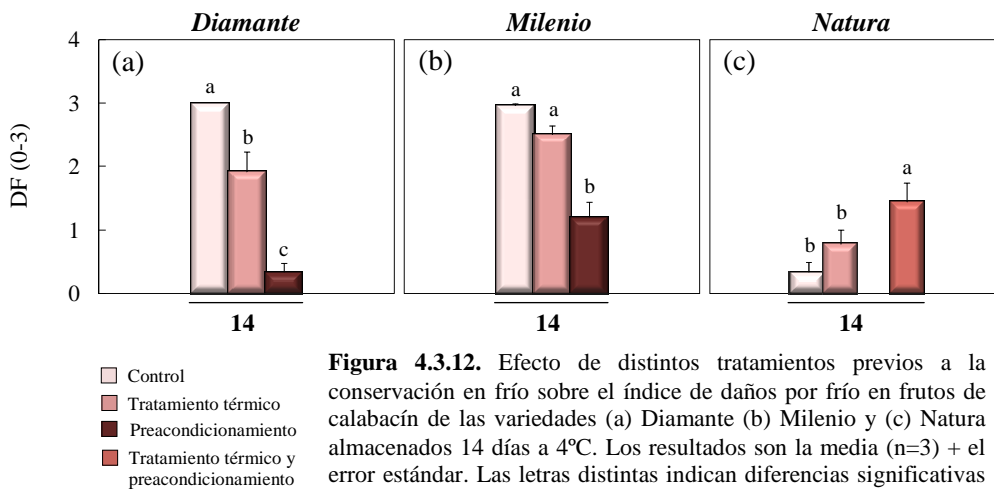
**Figura 4.3.11.** Efecto de distintos tratamientos previos a la conservación en frío sobre la pérdida de peso de frutos de calabacín de las variedades (a) Diamante (b) Milenio y (c) Natura tras 14 días a 4°C. Los resultados son la media (n=3) + el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).



El porcentaje de pérdida de peso de los frutos queda reflejado en la Figura 4.3.11. Los tratamientos aplicados no ocasionaron una reducción significativa de la pérdida de peso de los frutos en ninguna de las variedades estudiadas. El tratamiento combinado en los frutos de la variedad Natura produjo un incremento de este parámetro respecto a su control.

### c) Índice de daños por frío

El índice de daños por frío se vio afectado por los tratamientos (Figura 4.3.12). Se reduce el desarrollo de daños en los frutos preacondicionados de las tres variedades. También disminuyó este parámetro en los frutos tratados térmicamente de las variedades Diamante y Milenio. Los cambios encontrados en los frutos de Natura son menores por tratarse de frutos menos sensibles al frío. Los frutos de la variedad Natura con la combinación de tratamientos aumentaron los daños respecto al control.



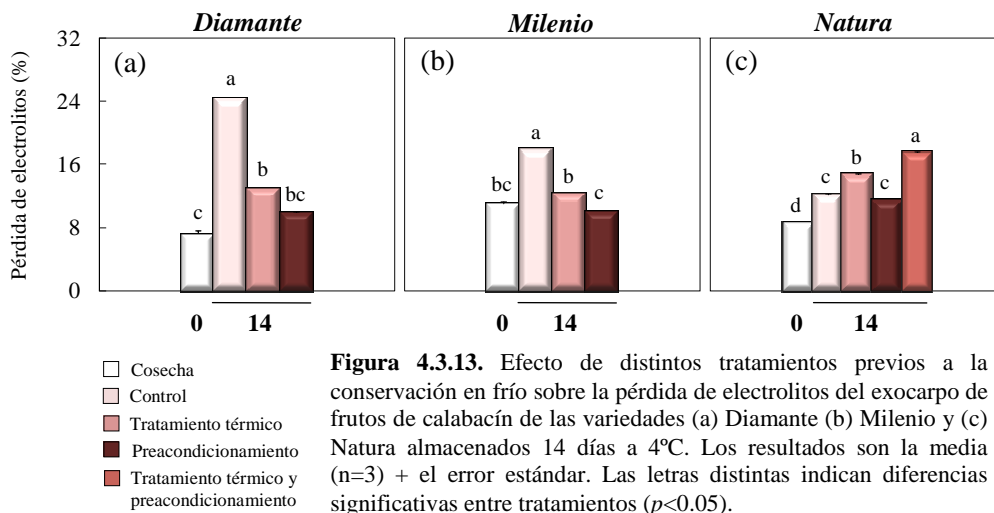
**Figura 4.3.12.** Efecto de distintos tratamientos previos a la conservación en frío sobre el índice de daños por frío en frutos de calabacín de las variedades (a) Diamante (b) Milenio y (c) Natura almacenados 14 días a 4°C. Los resultados son la media (n=3) + el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $p < 0.05$ ).

### d) Pérdida de electrolitos

La pérdida de electrolitos del exocarpo de los frutos se recoge en la Figura 4.3.13. En los frutos de Diamante y Milenio, los tratamientos aplicados reducen significativamente este parámetro. La reducción fue mayor en los frutos



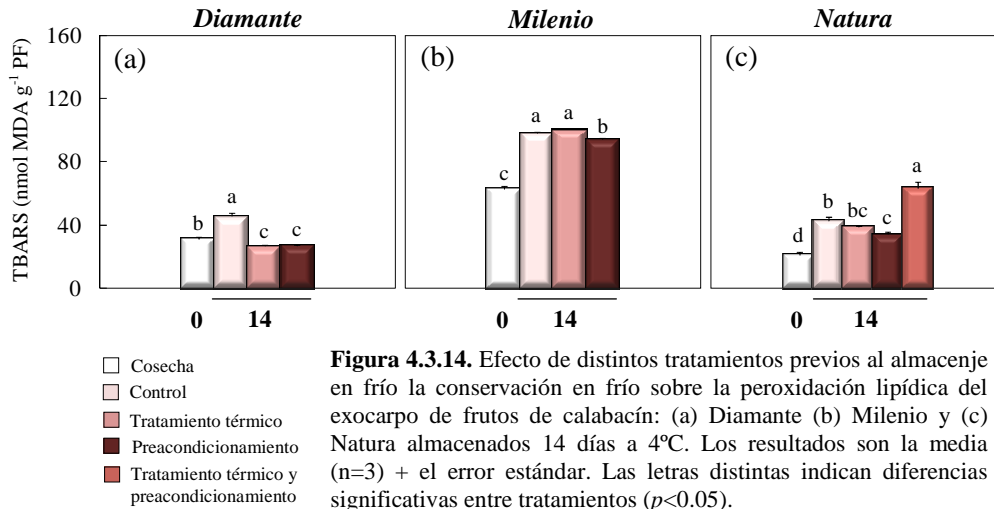
preacondicionados cuya pérdida de electrolitos no presentó diferencias con los valores presentados por los frutos recién cosechados. En Natura, en cambio, los frutos control y preacondicionados no presentaron diferencias significativas. La pérdida de electrolitos incrementó en los frutos sometidos al tratamiento combinado.



**Figura 4.3.13.** Efecto de distintos tratamientos previos a la conservación en frío sobre la pérdida de electrolitos del exocarpo de frutos de calabacín de las variedades (a) Diamante (b) Milenio y (c) Natura almacenados 14 días a 4°C. Los resultados son la media (n=3) + el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

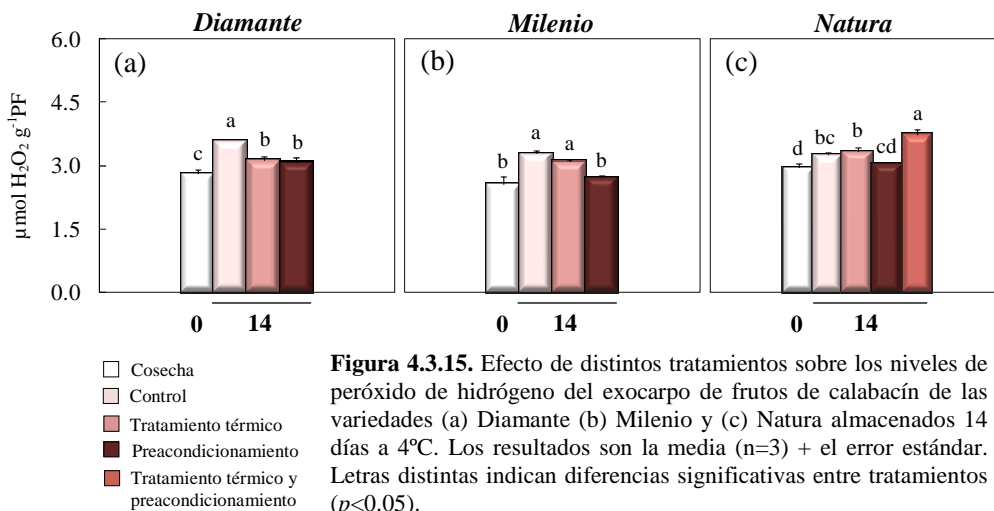
### e) Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica del exocarpo de los frutos se muestra en la Figura 4.3.14. En los frutos de todas las variedades, el preacondicionamiento disminuyó significativamente los niveles de peroxidación de los lípidos. El tratamiento térmico redujo este parámetro en los frutos de Diamante y Natura. El tratamiento combinado al que se sometieron los frutos de la variedad Natura, incrementó la peroxidación de los lípidos respecto a su correspondiente control, al igual que lo descrito para el índice de DF y la pérdida de electrolitos.



#### f) Niveles de peróxido de hidrógeno

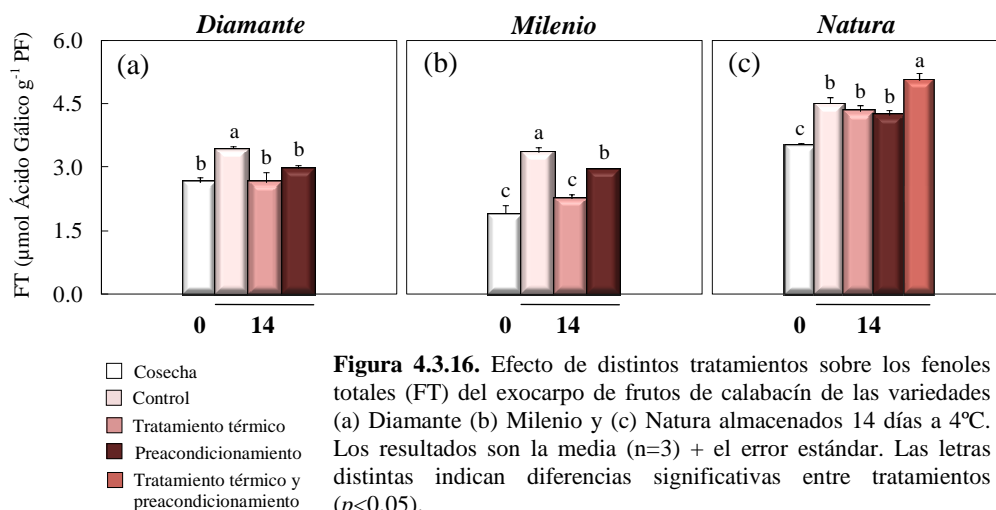
El contenido en peróxido de hidrógeno se recoge en la Figura 4.3.15. El preacondicionamiento fue el único de los tratamientos aplicados que disminuyó significativamente los niveles de  $H_2O_2$  del exocarpo todos los frutos. El tratamiento térmico produjo una reducción solo en Diamante. El tratamiento combinado presentó los niveles más elevados de  $H_2O_2$  de los frutos de Natura.





### g) Fenoles totales

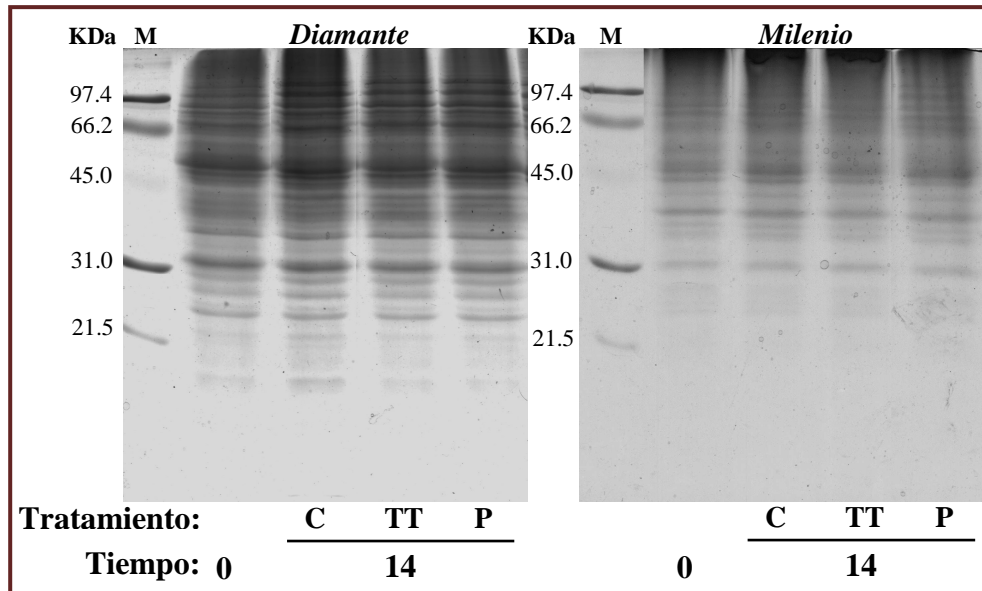
El contenido en fenoles totales del exocarpo de los frutos de Diamante, Milenio y Natura se refleja en la Figura 4.3.16. En Diamante y Milenio, los niveles de compuestos fenólicos se reducen con los dos tratamientos aplicados, mientras que en Natura solo se encontraron diferencias respecto a los frutos control con el tratamiento combinado, que aumentó los niveles de fenoles totales.



**Figura 4.3.16.** Efecto de distintos tratamientos sobre los fenoles totales (FT) del exocarpo de frutos de calabacín de las variedades (a) Diamante (b) Milenio y (c) Natura almacenados 14 días a 4°C. Los resultados son la media (n=3) + el error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### h) Patrón de proteínas

En los frutos de las variedades más sensibles, Diamante y Milenio, se estudió el patrón de proteínas del exocarpo para detectar posibles cambios debidos a los tratamientos aplicados. La Figura 4.3.17 recoge uno de los geles SDS-PAGE analizados. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en el patrón proteico del exocarpo de los frutos de ninguna de las variedades estudiadas entre los distintos tratamientos.



**Figura 4.3.17.** Efecto de distintos tratamientos previos a la conservación en frío sobre el patrón de proteínas del exocarpo de calabacín de las variedades Diamante y Milenio. En cada calle se cargaron 60 µg de proteína. M: marcador de pesos moleculares; C: control; TT: tratamiento térmico; P: preacondicionamiento.

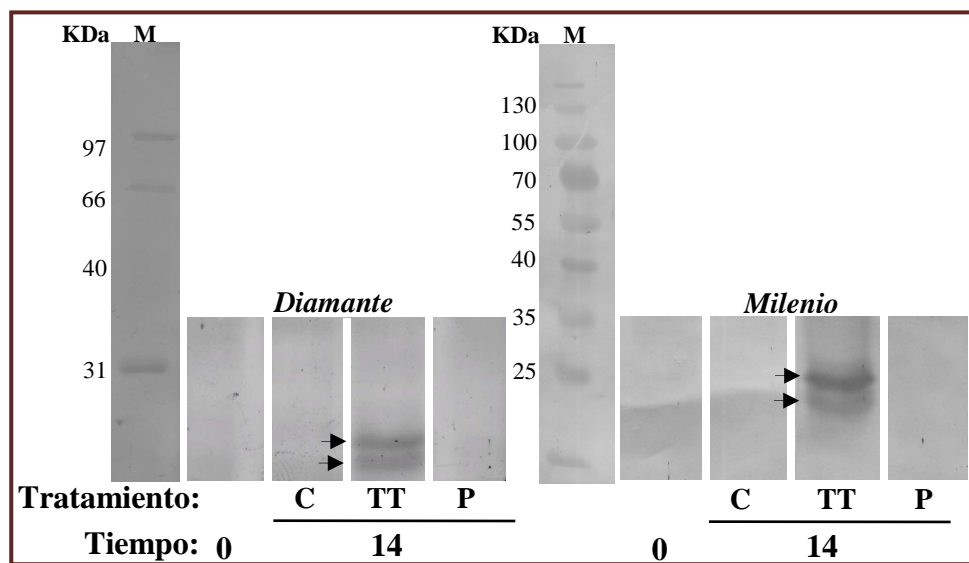
### i) Proteínas de estrés

Se estudio la posible acumulación de proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (smHSP) y de 60, 70 y 90 KDa (HSP60, HSP70 y HSP90) inducida por los tratamientos en los frutos de Diamante y Milenio (Figuras 4.3.18 y 19). Mediante la utilización del anticuerpo policlonal anti-HSP21 se detectó la acumulación de dos smHPS únicamente en los frutos a los que se había aplicado el tratamiento térmico (Flechas en Figura 4.3.18). El peso molecular aproximado de las mismas fue de 19 y 17 KDa. Con el anticuerpo monoclonal comercial anti-HSP70, también se detectaron dos bandas de aproximadamente 67 y 64 KDa. La de mayor tamaño presentó una expresión constitutiva en todas las muestras analizadas. La acumulación de la proteína de

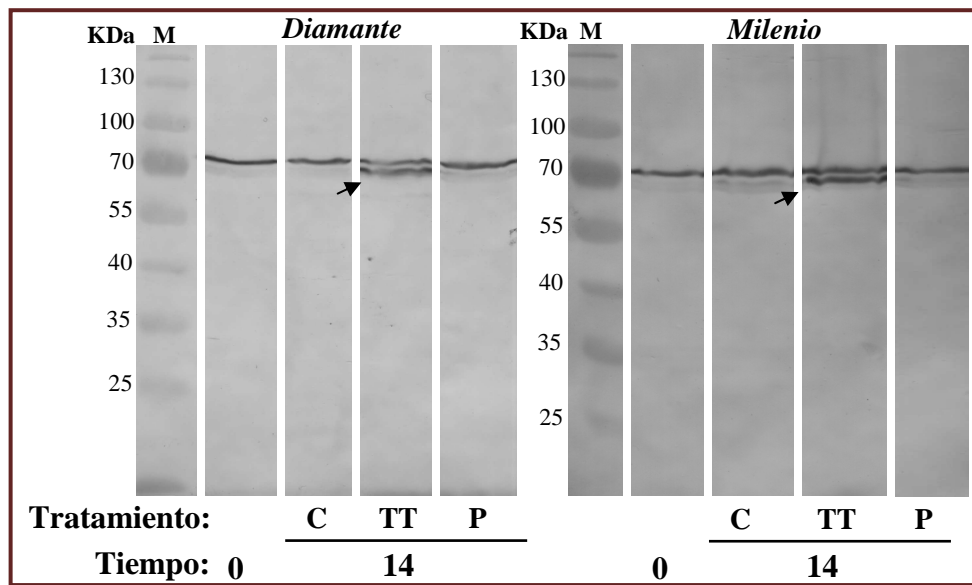




64 KDa fue muy baja excepto en los frutos a los que se había aplicado el tratamiento térmico (Flechas en la Figura 4.3.19). No se detectaron proteínas de choque térmico HSP60 y HSP90 en las muestras analizadas.



**Figura 4.3.14.** Efecto de distintos tratamientos sobre la acumulación de smHSP en el exocarpo de frutos Diamante y Milenio tras 0 y 14 días de almacenaje a 4°C. En cada calle se cargaron 60 µg de proteína total. M: marcador de pesos moleculares; C: control; TT: tratamiento térmico; P: preconditionamiento.



**Figura 4.3.14.** Efecto de distintos tratamientos sobre la acumulación de HSP70 en el exocarpo de frutos Diamante y Milenio tras 0 y 14 días de almacenaje a 4°C. En cada calle se cargaron 60 µg de proteína total. M: marcador de pesos moleculares; C: control; TT: tratamiento térmico; P: preacondicionamiento.



---

#### **4.4. CAPÍTULO 4: Cambios fisiológicos, bioquímicos moleculares inducidos por el preacondicionamiento en los frutos de calabacín**

En el capítulo anterior de esta memoria, se ha evaluado el efecto que tienen distintos tratamientos previos al almacenamiento sobre la respuesta al frío de frutos de calabacín de distintas variedades. Los resultados obtenidos han mostrado que la mayor reducción en la incidencia de los daños por frío se obtiene preacondicionando los frutos a una temperatura moderada antes de la conservación en frío. En este capítulo se profundiza en el estudio de los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares que tienen lugar en los frutos preacondicionados y que pueden estar relacionados con la tolerancia adquirida mediante el tratamiento a este estrés.

##### **4.1. Efecto del preacondicionamiento sobre el comportamiento postcosecha de los frutos de calabacín.**

Para llevar a cabo este estudio, se han empleado frutos de las variedades híbridas comerciales Natura y Sinatra. Los frutos se separaron en dos grupos: el primero fue almacenado directamente a 4°C (frutos control) y el segundo se preacondicionó durante 48 horas a 15°C antes de su almacenamiento en frío (frutos preacondicionados). Los frutos recién cosechados de las dos variedades se utilizaron como tiempo 0.

###### **a) Apariencia externa**

El aspecto externo de los frutos Natura y Sinatra empleados en este trabajo se muestra en la Figura 4.4.1. El preacondicionamiento hace que los frutos de Sinatra mantengan su calidad comercial tras la conservación en frío tras 14 días de almacenaje, presentando una apariencia similar a la de los frutos recién cosechados. En el caso de los frutos de Natura, los cambios debidos al preacondicionamiento son menos manifiestos debido a la mayor tolerancia al frío de esta variedad.

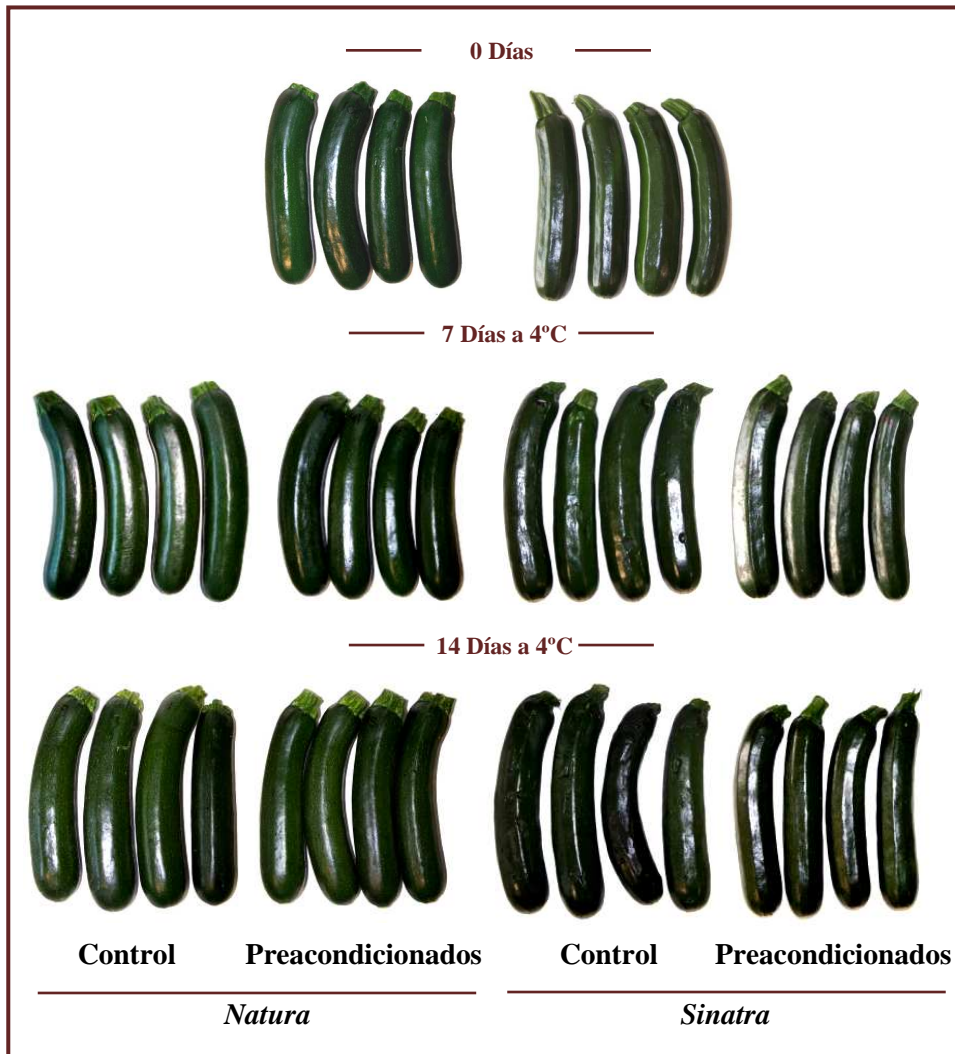


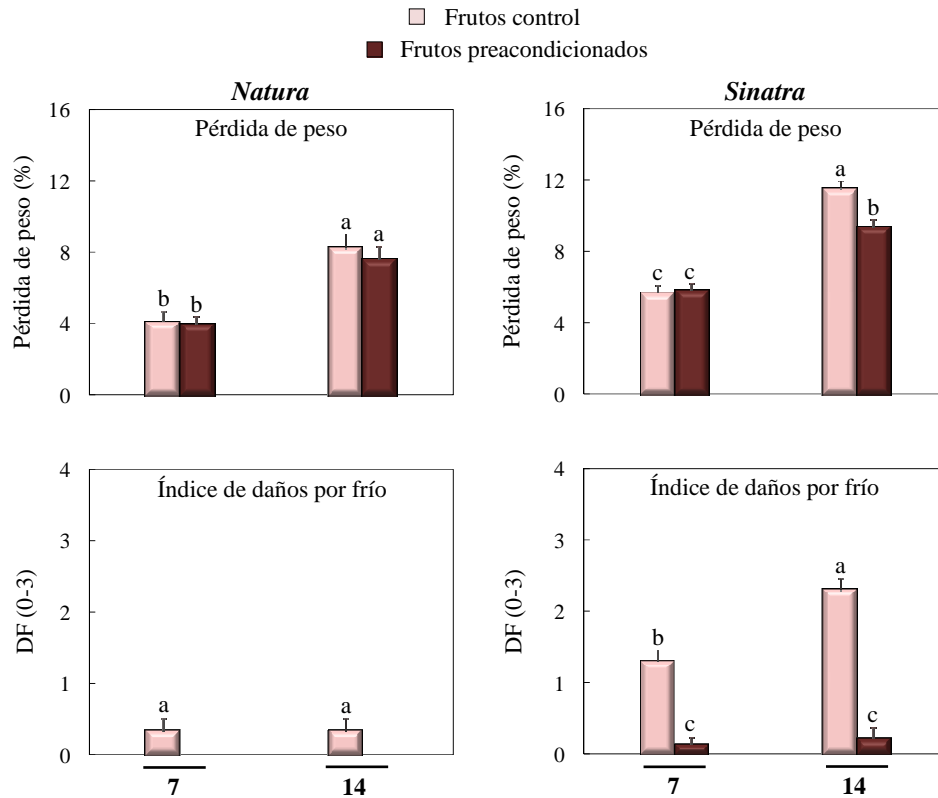
Figura 4.4.1. Efecto del tratamiento de acondicionamiento a 15°C durante 48 horas previo a la conservación en frío sobre el aspecto externo de frutos de calabacín de las variedades comerciales Natura y Sinatra.

#### b) Pérdida de peso y daños por frío

En la Figura 4.4.2, se muestra el porcentaje de pérdida de peso y el índice de daños por frío. El tratamiento de preacondicionamiento reduce la pérdida de peso tras 14 días en frío sólo en los frutos de Sinatra, variedad más



sensible al frío, mientras que en los de Natura no encontramos diferencias. El desarrollo de daños por frío sí disminuye con el tratamiento en los frutos de ambas variedades en los dos tiempos de conservación estudiados.



**Figura 4.4.2.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre la pérdida de peso y el índice de DF en frutos de calabacín de las variedades Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=15) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

### c) Análisis de pigmentos

Los cambios producidos en el contenido de pigmentos del exocarpo en frutos preacondicionados y control durante su almacenamiento en frío quedan reflejados en la Tabla 4.4.1. En general, en los frutos de las dos variedades se produce una disminución en los niveles de clorofila, que es menor en frutos preacondicionados.



**Tabla 4.4.1.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre el contenido en pigmentos ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$ ) del exocarpo de frutos de calabacín conservados en frío.

Variedad/Tiempo	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Carotenos y xantofilas	Pigmentos totales	
<i>Natura</i>						
<b>0</b>	279.7 <sup>a</sup>	161.0 <sup>a</sup>	427.5 <sup>a</sup>	32.6 <sup>b</sup>	440.1 <sup>a</sup>	
<b>14</b>	Control	232.4 <sup>b</sup>	78.2 <sup>b</sup>	312.5 <sup>c</sup>	72.4 <sup>a</sup>	391.6 <sup>c</sup>
	Preacondicionados	243.7 <sup>b</sup>	123.3 <sup>ab</sup>	358.8 <sup>b</sup>	73.0 <sup>a</sup>	422.0 <sup>b</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	16.5	24.7	25.6 <sup>a</sup>	11.8 <sup>a</sup>	27.6	
<i>p</i> -valor	Tiempo ( <i>d</i> )	***	***	***	***	**
	Tratamiento ( <i>t</i> )	ns	*	*	ns	ns
	<i>dxt</i>	ns	*	*	ns	ns
<i>Sinatra</i>						
<b>0</b>	212.5 <sup>a</sup>	56.2 <sup>b</sup>	314.8 <sup>a</sup>	55.5 <sup>b</sup>	409.3 <sup>a</sup>	
<b>14</b>	Control	190.5 <sup>b</sup>	58.4 <sup>b</sup>	268.5 <sup>b</sup>	94.4 <sup>b</sup>	372.5 <sup>b</sup>
	Preacondicionados	221.4 <sup>a</sup>	87.4 <sup>a</sup>	298.2 <sup>a</sup>	122.7 <sup>a</sup>	416.1 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	19.0	13.7	26.1	10.4	29.8	
<i>p</i> -valor	Tiempo ( <i>d</i> )	ns	**	**	***	ns
	Tratamiento ( <i>t</i> )	*	**	ns	**	*
	<i>dxt</i>	*	**	ns	**	*

Los datos son la media de 3 réplicas. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente ( $p < 0.05$ ) usando el test MDS. Los niveles de significación están representados por \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y ns (no significativo).

## 4.2. Efecto del preacondicionamiento sobre los cambios producidos en las membranas por el frío

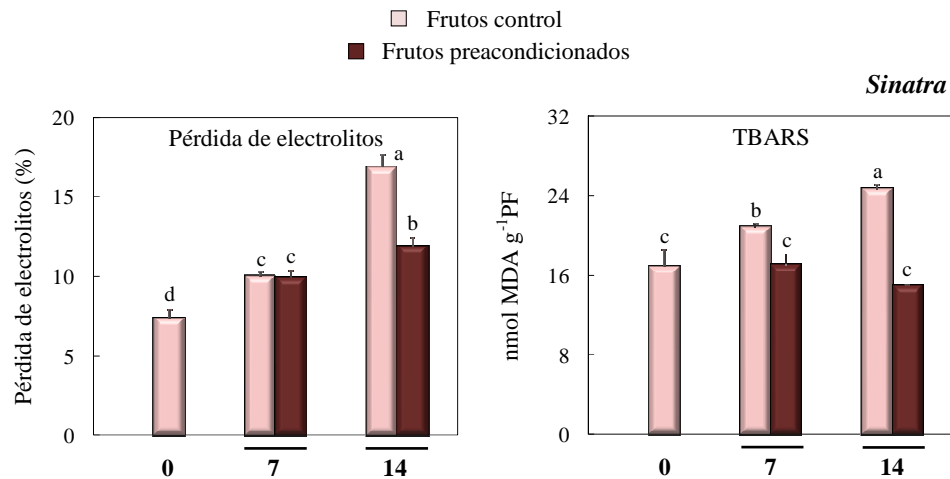
Para analizar los cambios que tienen lugar en las membranas de los frutos preacondicionados durante la conservación en frío, se ha elegido la variedad Sinatra debido a que, por su mayor sensibilidad al frío, los frutos tratados de esta variedad presentaban una mayor diferencia con respecto a su control en cuanto al desarrollo de daños por frío.

### a) Pérdida de electrolitos y peroxidación lipídica

Se determinó la pérdida de electrolitos y la peroxidación lipídica en el exocarpo de los frutos (Figura 4.4.3). La pérdida de electrolitos aumentó con el frío pero, tras 14 días de almacenamiento a 4°C, este parámetro fue un 30% menor en los frutos preacondicionados. El contenido en MDA no incrementó en



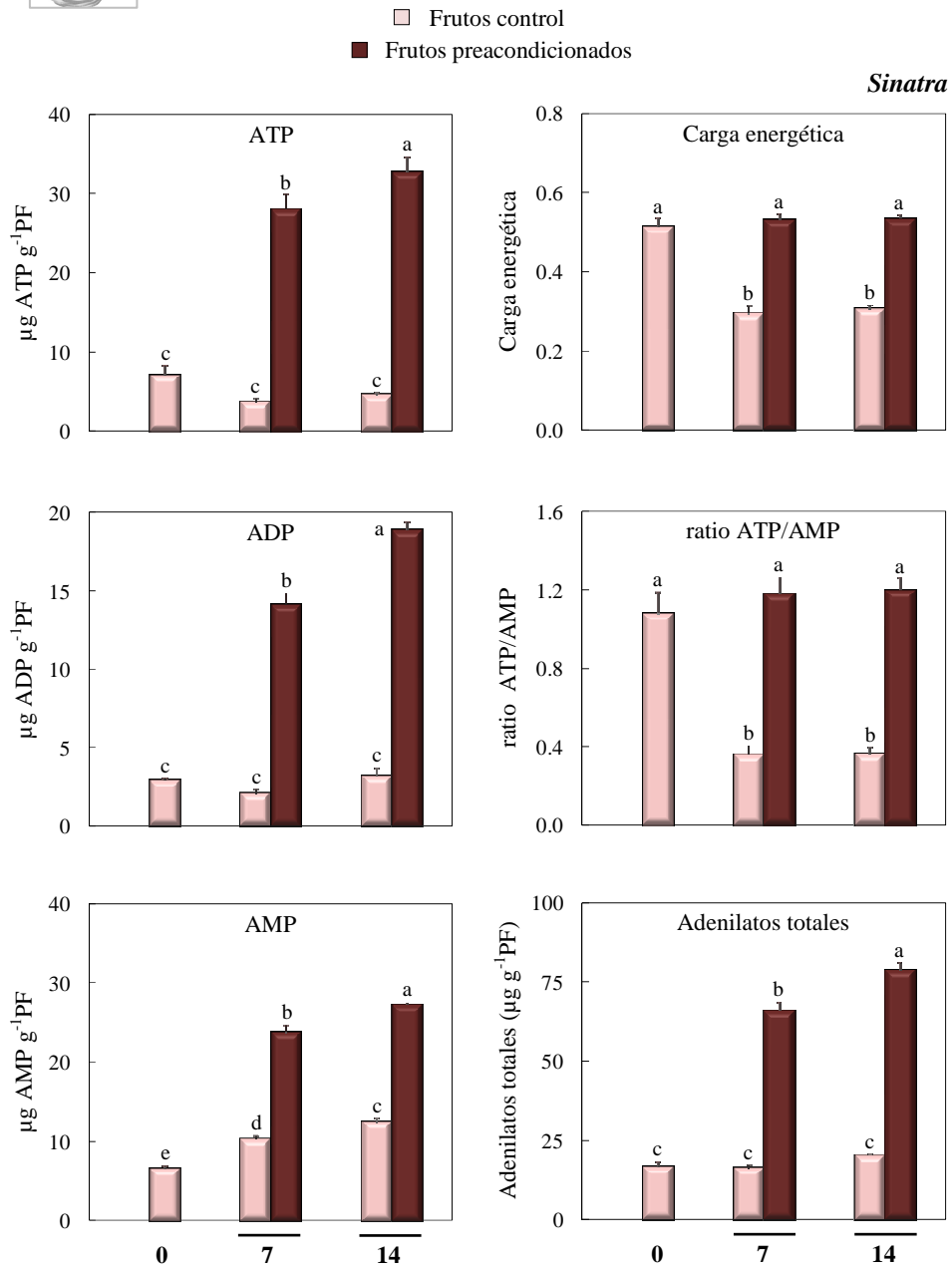
el exocarpo de los frutos preacondicionados, sin embargo, en los frutos control aumentó significativamente tras 7 y 14 días de conservación en frío.



**Figura 4.4.3.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre la pérdida de electrolitos y el contenido en MDA en exocarpo de frutos de la variedad Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

## b) Estatus energético

Se ha cuantificado el contenido en ATP, ADP y AMP, y, a partir de los valores obtenidos, se han calculado los parámetros carga energética, ratio ATP/AMP y contenido total de adenilatos (Figura 4.4.4). Después de 7 y 14 días a 4°C, el exocarpo de los frutos preacondicionados incrementó su contenido en ATP, ADP y AMP 7.5, 7 y 2 veces respecto al contenido en los frutos control. Tanto la carga energética como la ratio ATP/AMP se mantuvieron en los frutos tratados, mientras que en los frutos control disminuyó en un 50% y 70% respectivamente durante la conservación en frío. En los frutos preacondicionados, el contenido total de adenilatos aumentó respecto a los valores iniciales 4 y 5 veces tras 7 y 14 días en frío respectivamente.



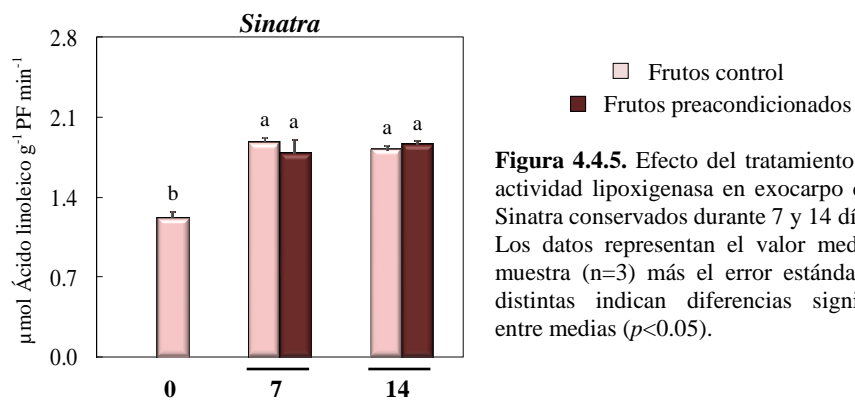
**Figura 4.4.4.** Efecto del tratamiento de precondicionamiento sobre los niveles de ATP, ADP, AMP, carga energética, ratio ATP/AMP y adenilatos totales del exocarpo de frutos Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p<0.05$ ).





**c) Actividad lipoxigenasa**

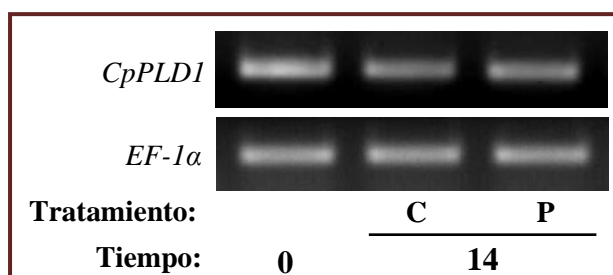
Los resultados de esta actividad enzimática se recogen en la Figura 4.4.5. Con el tratamiento, la LOX no se ve afectada, presentando los mismos niveles de actividad los frutos Sinatra preconditionados y control.



**Figura 4.4.5.** Efecto del tratamiento sobre la actividad lipoxigenasa en exocarpo de frutos Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p<0.05$ ).

**d) Expresión de fosfolipasa D de fruto, *CpPLD1***

El análisis de la expresión de *CpPLD1* se llevó a cabo mediante RT-PCR semicuantitativa (Figura 4.4.6). No se encontraron diferencias entre los frutos control y preconditionados.



**Figura 4.4.6.** Análisis el efecto del preconditionamiento de los frutos de Sinatra sobre la expresión en el exocarpo de *CpPLD1*.



### e) Contenido en ácidos grasos

Se cuantificó el contenido en ácidos grasos del exocarpo de los frutos para evaluar posibles cambios y su relación con el preacondicionamiento (Tabla 4.4.2). Los resultados mostraron un drástico incremento en los niveles de los cuatro ácidos grasos medidos, tanto saturados como insaturados, en los frutos preacondicionados. Además, después de 14 días de conservación en frío, el contenido total de ácidos grasos pasó de unos 7 mg por g de peso fresco en el exocarpo de los frutos recién cosechados (tiempo 0) a 7.6 y 20.6 mg en frutos control y preacondicionados respectivamente. El incremento tan pronunciado en el contenido en ácidos grasos con el preacondicionamiento y la menor pérdida de peso nos hizo especular con la idea de que el preacondicionamiento indujera un mayor desarrollo de la cutícula en la epidermis del fruto.

**Tabla 4.4.2.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre el contenido en ácidos grasos ( $\text{mg g}^{-1}\text{PF}$ ) del exocarpo de frutos de calabacín de la variedad Sinatra.

Tiempo Tratamiento	Ácidos grasos saturados		Ácidos grasos insaturados		Totales	
	Palmitico (16:0)	Esteárico (18:0)	Linoleico (18:2)	Linolénico (18:3)		
<b>Sinatra</b>						
<b>0</b>	1.85 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	0.77 <sup>b</sup>	3.89 <sup>c</sup>	7.0 <sup>b</sup>	
<b>14</b>	Frutos control	1.57 <sup>b</sup>	0.59 <sup>b</sup>	0.41 <sup>c</sup>	5.05 <sup>b</sup>	7.6 <sup>b</sup>
	Frutos preacondicionados	5.54 <sup>a</sup>	3.54 <sup>a</sup>	1.46 <sup>a</sup>	10.08 <sup>a</sup>	20.6 <sup>a</sup>
MDS <sub>0,05</sub>	0.88	0.68	0.30	0.95	2.7	
<i>p</i> -valor	Tiempo ( <i>d</i> )	***	***	ns	***	***
	Tratamiento ( <i>t</i> )	***	***	***	***	***
	<i>dxt</i>	***	***	***	***	***

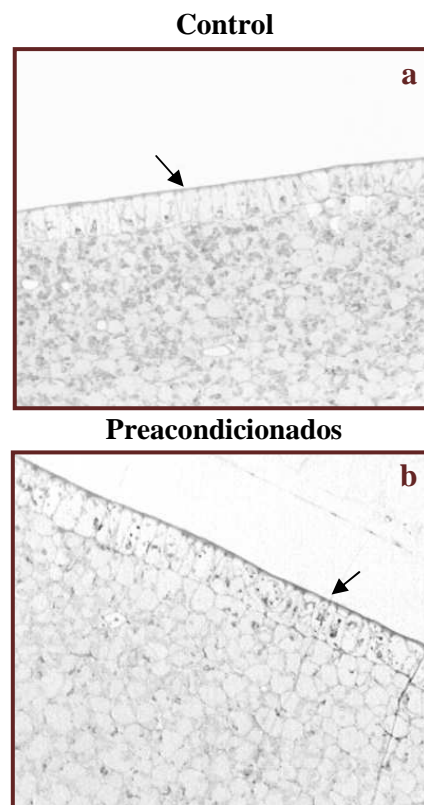
Los datos son la media de 3 réplicas. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente ( $p < 0.05$ ) usando el test MDS. Los niveles de significación están representados por \*\*\*  $p < 0.001$  y ns (no significativo).

### f) Análisis microscópicos

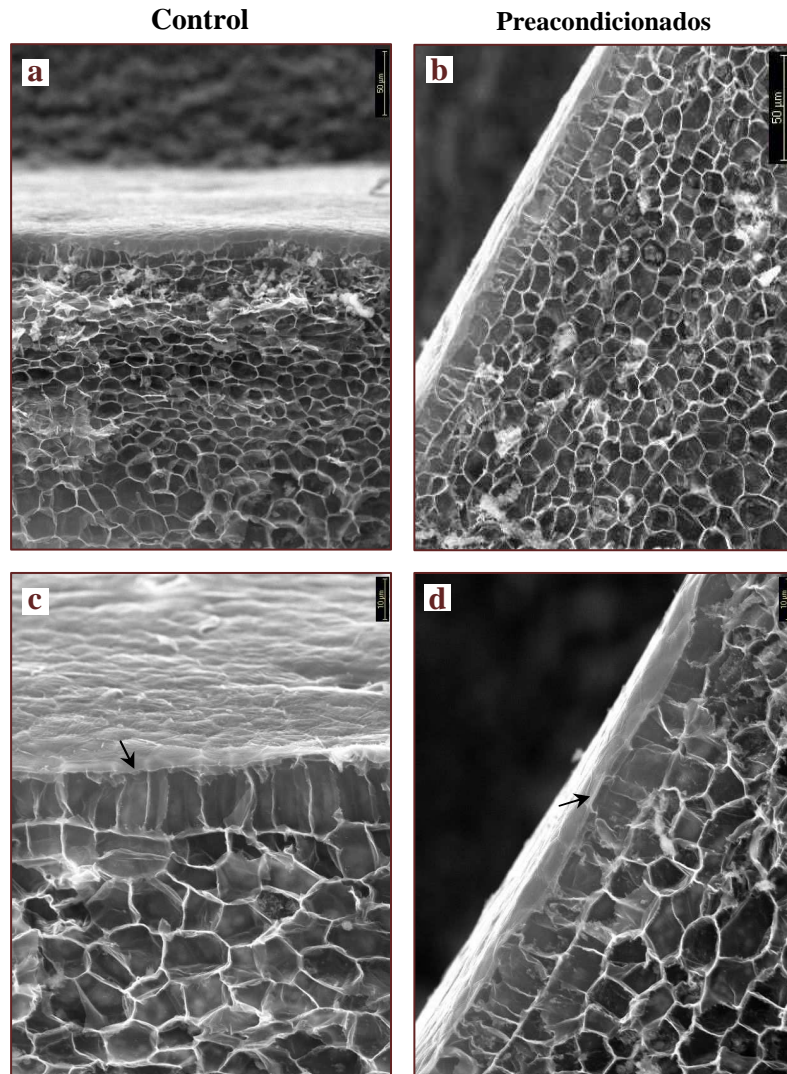
Para estudiar posibles cambios de grosor de la cutícula, se analizó el exocarpo de los frutos control y preacondicionados mediante microscopía óptica (Figura 4.4.7) y electrónica, tanto de barrido como de transmisión (Figuras 4.4.8 y 4.4.9). Las imágenes de microscopía óptica mostraron una que la cutícula de



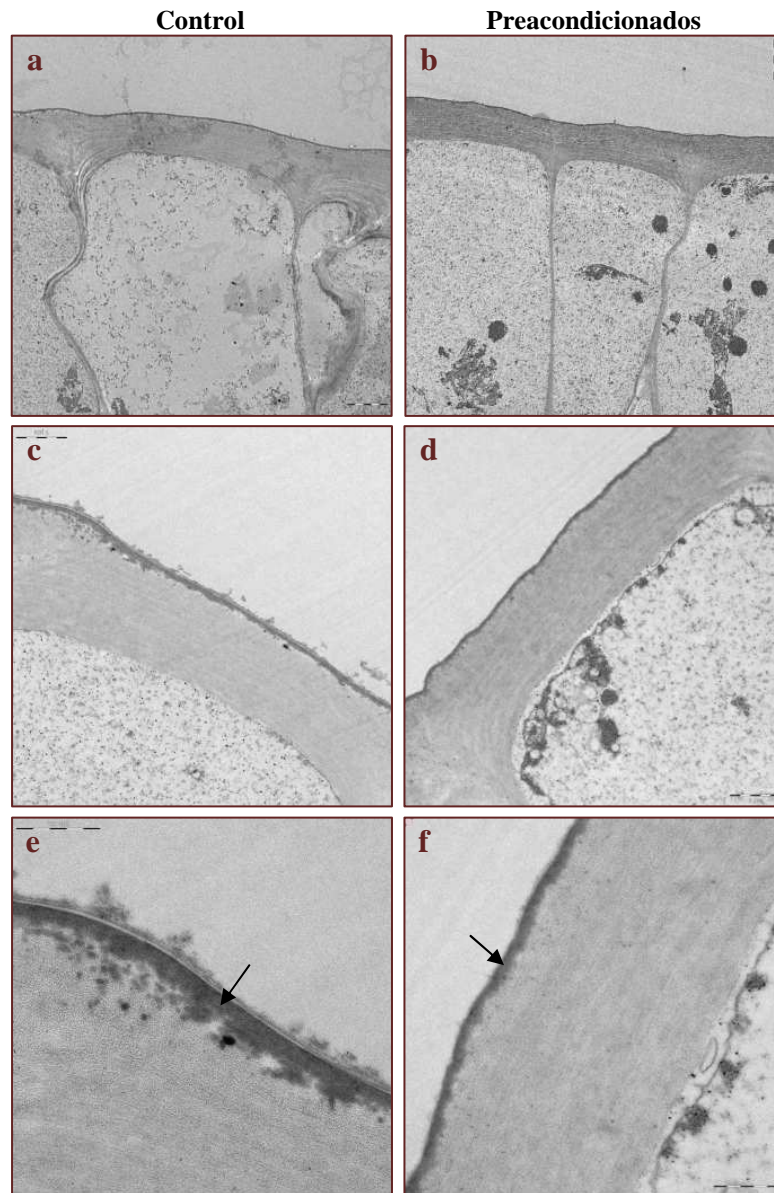
los frutos preacondicionados podría tener mayor grosor que la de los frutos control. La comprobación de la posible diferencia de grosor, se realizó mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión. Mediante microscopía electrónica de barrido, no se apreciaron diferencias ni tampoco fue posible la medida del grosor de la cutícula. Sin embargo, con microscopía electrónica de transmisión se realizaron distintas medidas que indicaron que en ambos casos la cutícula presentaba un espesor comprendido entre 0.05 y 0.15  $\mu\text{m}$  sin que se pudieran apreciar diferencias significativas con el preacondicionamiento.



**Figura 4.4.7.** Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina del exocarpo de frutos Sinatra control (a) y preacondicionados (b) después de 14 días a 4°C. Las flechas señalan la cutícula situada sobre las células epidérmicas.



**Figura 4.4.8.** Imágenes a microscopio electrónico de barrido del exocarpo de frutos Sinatra control (a y c) y precondicionados (b y d) después de 14 días a 4°C. La flecha señala la cutícula situada sobre las células epidérmicas. En los paneles a y b la barra corresponde a un tamaño de 50 μm mientras que en c y d es de 10 μm.

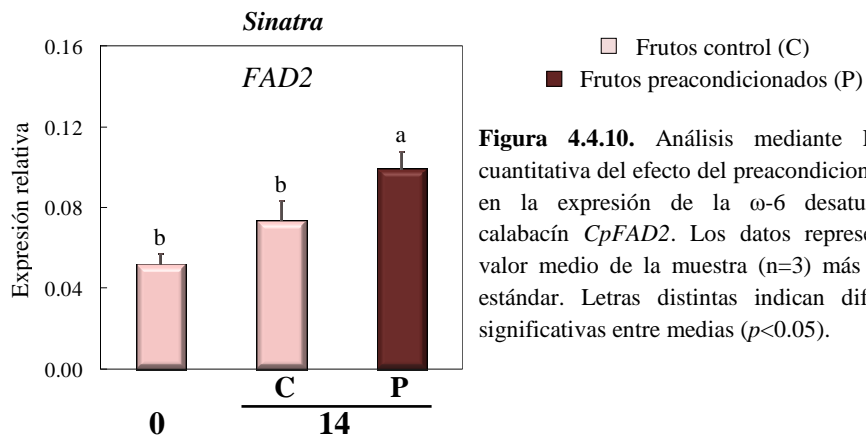


**Figura 4.4.9.** Imágenes a microscopio electrónico de transmisión del exocarpo de frutos Sinatra control (a, c y e) y preacondicionados (b, d y f) después de 14 días a 4°C. Las flechas señalan la cutícula situada sobre las células epidérmicas. En los paneles a y b la barra corresponde a un tamaño de 2  $\mu\text{m}$ , en c y d es de 1  $\mu\text{m}$  y en e y f de 0.9  $\mu\text{m}$ .



### g) Expresión de $\omega$ -6 desaturasa *CpFAD2*

Debido al incremento en el contenido en ácidos grasos insaturados que se produce durante la frigoconservación de los frutos de calabacín, se estudió mediante RT-PCR cuantitativa la expresión de una  $\omega$ -6 desaturasa *CpFAD2* de calabacín, cuya secuencia estaba se encontraba disponible en las bases de datos (Figura 4.4.10). La expresión de *CpFAD2* aumentó con el almacenamiento en frío de los frutos pero este incremento sólo fue significativo en los frutos preacondicionados.

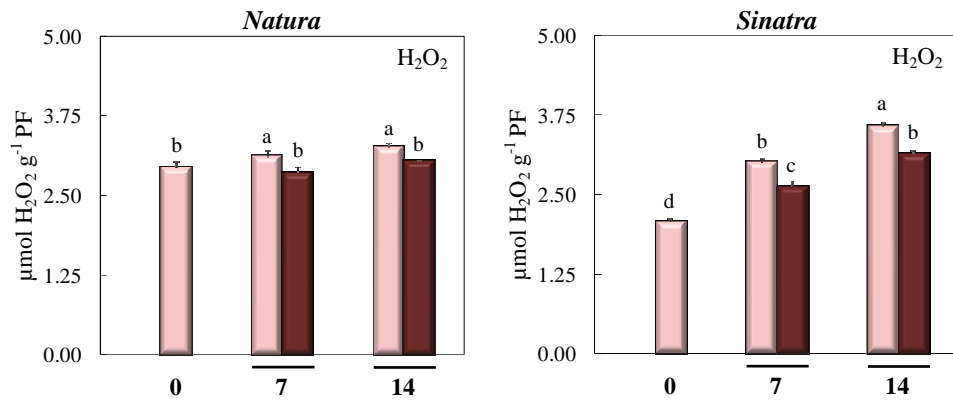


**Figura 4.4.10.** Análisis mediante RT-PCR cuantitativa del efecto del preacondicionamiento en la expresión de la  $\omega$ -6 desaturasa de calabacín *CpFAD2*. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

### 4.3. Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre el metabolismo oxidativo

#### a) Contenido en $H_2O_2$

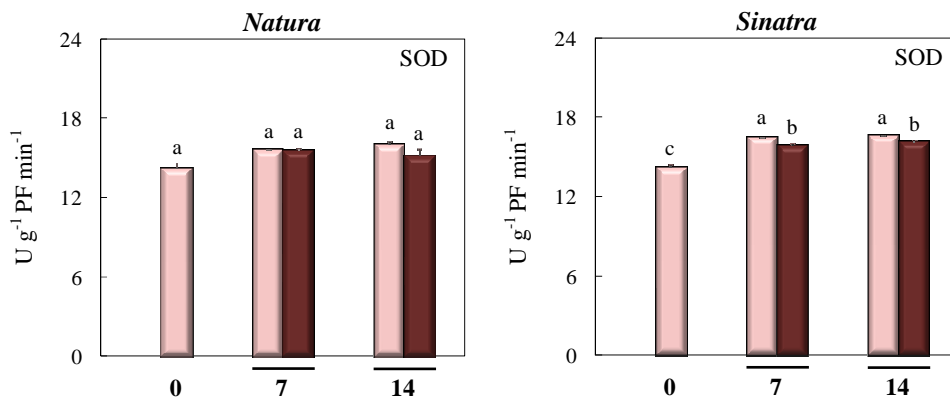
En la Figuras 4.4.11, quedan reflejados los resultados obtenidos de la determinación del  $H_2O_2$ . Los frutos Natura preacondicionados mantuvieron el contenido inicial de  $H_2O_2$  mientras que los controles incrementaron los niveles de peróxido. En los frutos Sinatra preacondicionados aumentó el nivel de  $H_2O_2$ , pero se redujo significativamente respecto a los frutos control.



**Figura 4.5.11.** Efecto del tratamiento de precondicionamiento sobre la actividad SOD en el exocarpo de frutos Natura y Sintra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ). □ Frutos control ■ Frutos precondicionados.

### b) Actividad superóxido dismutasa

En los frutos de ambas variedades, el precondicionamiento resultó en una disminución de la actividad SOD que sólo fue significativa en los frutos Sintra (Figura 4.4.12).



**Figura 4.5.12.** Efecto del tratamiento de precondicionamiento sobre la actividad SOD en el exocarpo de frutos Natura y Sintra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ). □ Frutos control ■ Frutos precondicionados.



La actividad SOD en los frutos de la variedad Sinatra también se estudió en geles nativos de poliacrilamida (Figura 4.4.13). La tinción específica reveló 3 bandas en todas las muestras analizadas que no presentaron diferencias entre tratamientos. Las distintas isoformas de SOD fueron identificadas mediante incubación con los inhibidores específicos  $\text{CN}^-$  y/o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los resultados mostraron que las bandas correspondían con una Mn-SOD (Mn-SOD 1) y con dos Cu/Zn-SOD (Cu/Zn-SOD 1 y Cu/Zn-SOD 2). No se detectó actividad Fe-SOD.

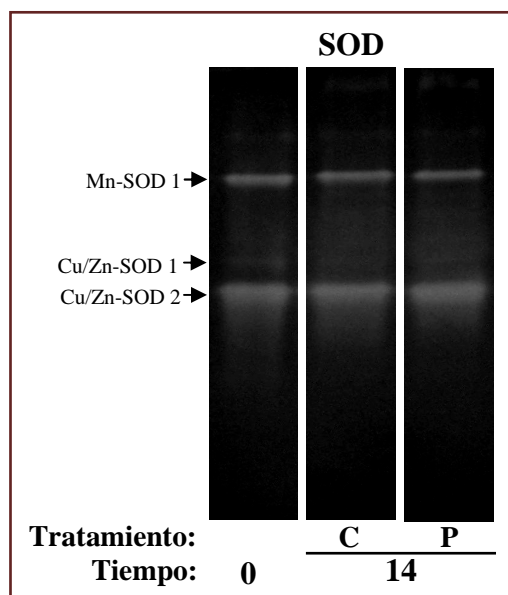
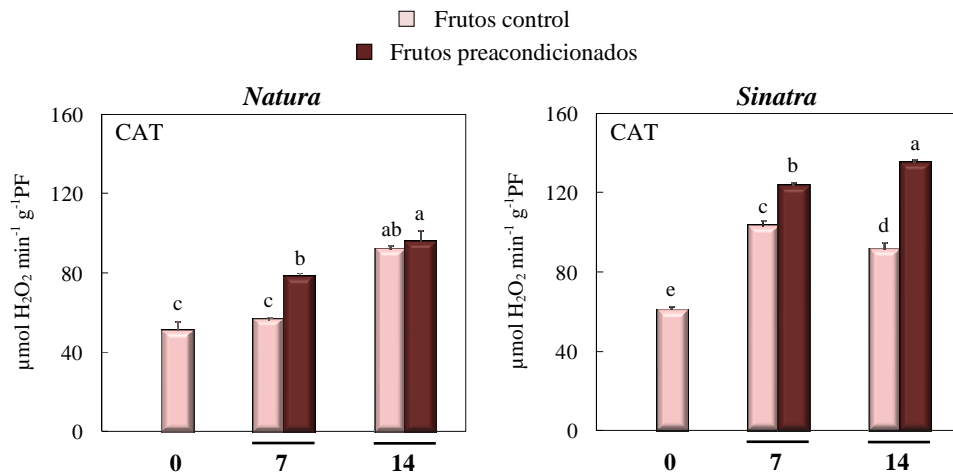


Figura 4.4.13. Efecto del preacondicionamiento sobre la actividad SOD del exocarpo de frutos de la variedad Sinatra conservados 14 días a 4°C.

### c) Actividad catalasa

Los datos obtenidos en la determinación de la actividad CAT se muestran en la Figura 4.4.14. En Natura, sólo encontramos diferencias con el preacondicionamiento a los 7 días en frío. En cambio, los frutos Sinatra preacondicionados mostraron una actividad catalasa significativamente mayor que los frutos sin tratar tanto a los 7 como a los 14 días.





**Figura 4.4.14.** Efecto del tratamiento de precondicionamiento sobre la actividad CAT en el exocarpo de frutos Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

#### d) Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa total se midió en el exocarpo de los frutos de las dos variedades y los datos obtenidos quedan reflejados en la Tabla 4.4.3. En los frutos Natura, no se encontraron diferencias significativas en esta actividad con el precondicionamiento. Sin embargo, en Sinatra, la actividad peroxidasa total fue mayor en los frutos precondicionados.

**Tabla 4.4.3.** Efecto del precondicionamiento sobre la actividad peroxidasa total del exocarpo de frutos de calabacín conservados 14 días a 4°C.

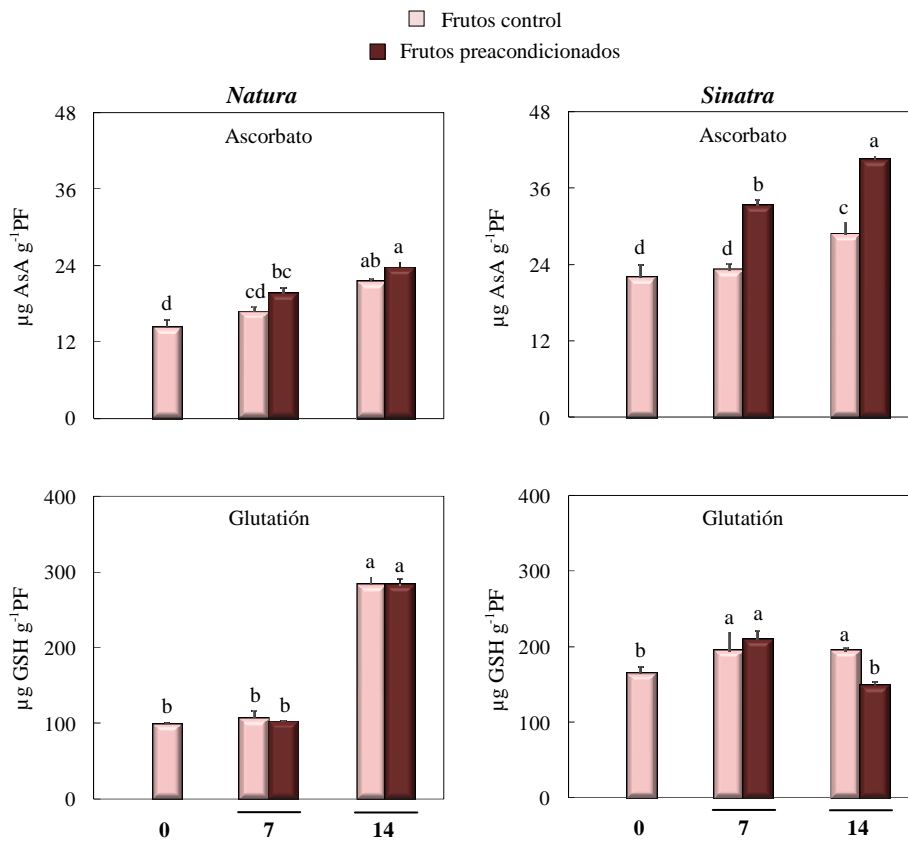
Tiempo/Tratamiento	POD total ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PF}$ )	
	Natura	Sinatra
0	6.0 <sup>b</sup>	4.5 <sup>c</sup>
14	Control	54.6 <sup>b</sup>
	Precondicionados	62.5 <sup>a</sup>
MDS <sub>0.05</sub>	0.8	4.4
p-valor	Tiempo (d)	***
	Tratamiento (t)	**
	dxt	***

Los datos son la media de 3 réplicas. Valores seguidos por la misma letra no difieren de forma significativa ( $p < 0.05$ ). Los niveles de significación están representados por \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .



### e) Ciclo ascorbato-glutación

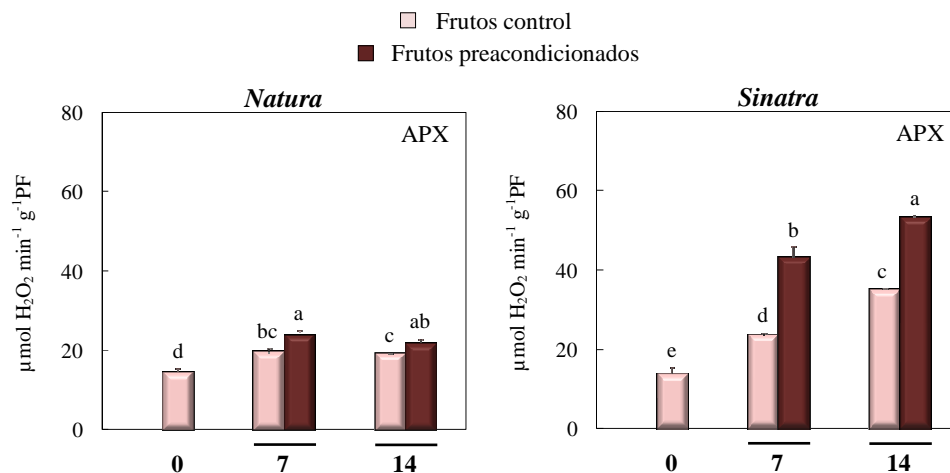
El preacondicionamiento indujo un incremento en el contenido en ascorbato total en el exocarpo de los frutos preacondicionados de ambas variedades (Figura 4.4.15), especialmente en los frutos preacondicionados de Sinatra, se detectó un incremento del 45 y 40% de ascorbato total respecto al control a los 7 y 14 días de conservación respectivamente. Por el contrario, el glutación total presenta pocas diferencias con el preacondicionamiento (Figura 4.4.15).



**Figura 4.4.15.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre el contenido total en ascorbato y glutación en exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p<0.05$ ).

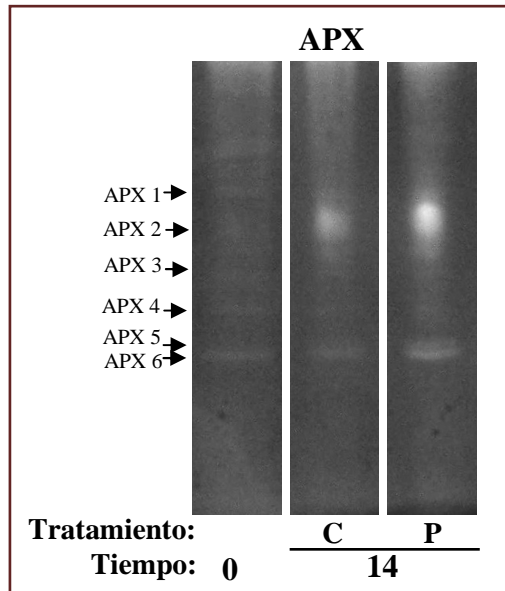


En los frutos preacondicionados de Natura y Sinatra la actividad ascorbato peroxidasa fue significativamente mayor que la de sus respectivos frutos control tras 7 y 14 días de conservación en frío (Figura 4.4.16). Destacan las diferencias encontradas en Sinatra, siendo de un 83 y 52% después de 7 y 14 días a 4°C.



**Figura 4.4.16.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre la actividad APX en el exocarpo de frutos Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

La actividad enzimática APX en los frutos Sinatra también se analizó en geles nativos de poliacrilamida (Figura 4.4.17). La tinción específica mostró 6 bandas reactivas con distinto comportamiento debido tanto a la conservación en frío como al tratamiento de preacondicionamiento. APX 1 sólo pudo ser detectada en el exocarpo de los frutos recién cosechados, desapareciendo con la conservación a 4°C de los frutos. Las demás isoformas, APX 2, APX 3, APX 4, APX 5 y APX 6, se encontraron en todas las condiciones estudiadas. Podemos destacar el incremento de actividad con el tratamiento de preacondicionamiento de las bandas APX 2, APX 5 y APX 6, de la misma forma que ocurriera con la determinación de la actividad *in vitro* (Figura 4.4.16).

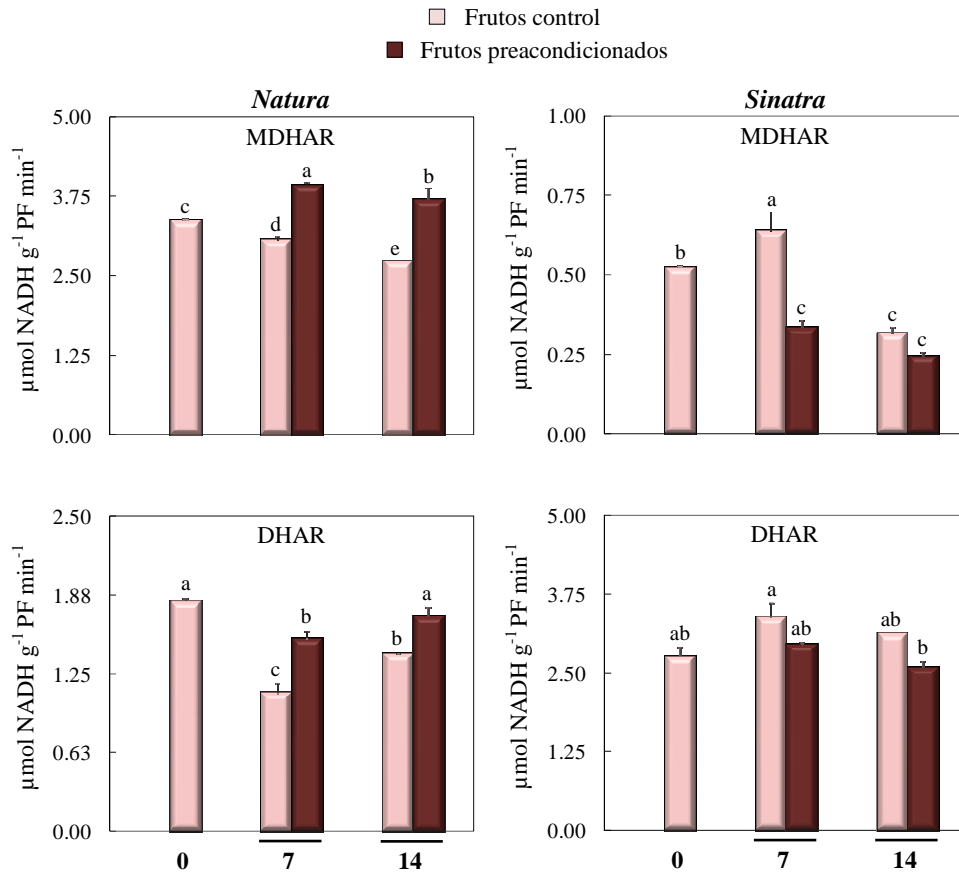


**Figura 4.4.17.** Efecto del preacondicionamiento sobre la actividad APX en gel del exocarpo de frutos de la variedad Sinatra conservados 14 días a 4°C.

Se ha analizado la actividad de las enzimas monodeshidroascorbato reductasa y deshidroascorbato reductasa y los valores resultantes quedan recogidos en la Figura 4.4.18. Estas enzimas muestran un comportamiento opuesto con el tratamiento de preacondicionamiento en los frutos de las variedades estudiadas. Los frutos tratados de la variedad Natura incrementan significativamente la actividad MDHAR respecto a sus frutos control en los dos tiempos de almacenamiento estudiados, presentando unas diferencias de hasta un 30% al final del periodo de conservación. La enzima DHAR presenta la misma respuesta con el tratamiento de acondicionamiento que la anterior en el exocarpo de los frutos de la variedad Natura. En la variedad Sinatra, los frutos preacondicionados disminuyeron la actividad MDHAR en su exocarpo, pudiéndose observar una mayor diferencia con los frutos control tras 7 días de conservación a 4°C donde la actividad MDHAR presenta un 50% de reducción. A los 14 días, en cambio, esta diferencia pasó a no ser significativa. Las tendencias encontradas en la actividad DHAR son las mismas que para la



anterior enzima tanto en el exocarpo de los frutos *Natura* como *Sinatra*, aunque en los frutos de esta última variedad las diferencias entre los frutos preacondicionados y control no son significativas.

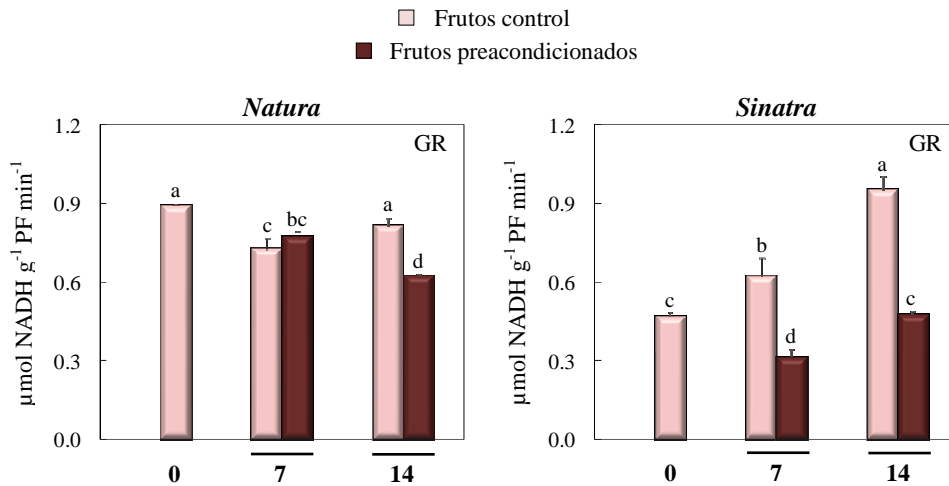


**Figura 4.4.18.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre las actividades MDHAR y DHAR en el exocarpo de frutos *Natura* y *Sinatra* conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 4.4.19, se muestran los resultados de la actividad glutatión reductasa. El preacondicionamiento origina una reducción de la actividad de esta enzima en los frutos de ambas variedades. En los frutos *Sinatra* las diferencias con el tratamiento son más acusadas, de forma que a los 14 días en



frío encontramos que la actividad GR es la mitad en frutos preacondicionados que en su control.



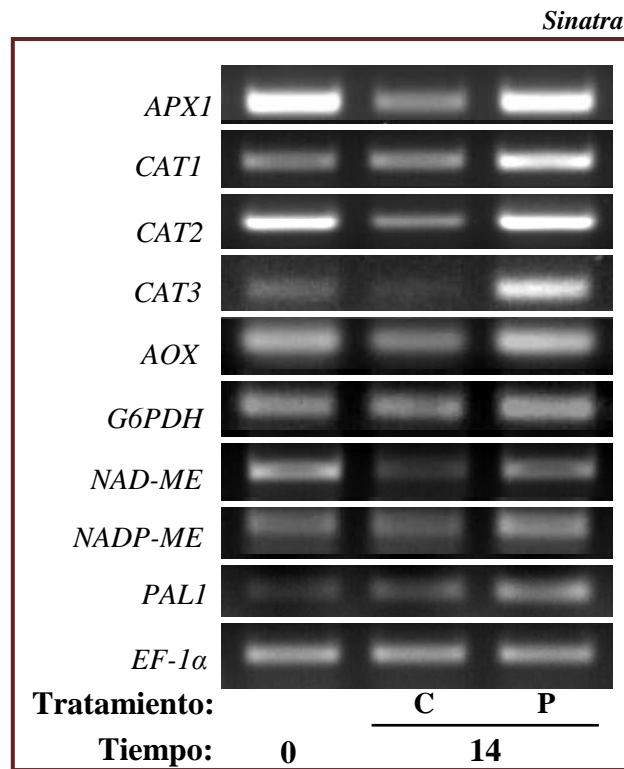
**Figura 4.4.19.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre la actividad GR en el exocarpo de frutos Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

#### f) Expresiones

Con objeto de evaluar el efecto del preacondicionamiento previo a la conservación en frío sobre la transcripción de distintos genes relacionados con la defensa antioxidante, se ha realizado un análisis mediante RT-PCR semicuantitativa utilizando ADNc sintetizado a partir de ARN total aislado del exocarpo de frutos de la variedad Sinatra recién cosechados, control y preacondicionados tras 14 días de almacenamiento a 4°C. Se ha estudiado la expresión de genes de las enzimas ascorbato peroxidasa (*APXI*) y catalasa (*CAT1*, 2 y 3), oxidasa alternativa (*AOX*), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PDH*), enzima málico dependiente de  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NAD}^+$ -EM) y de  $\text{NADP}^+$  ( $\text{NADP}^+$ -EM). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.4.20. En ella podemos observar como el exocarpo de los frutos preacondicionados acumula más ARNm de todos los genes estudiados en comparación con los frutos control. Destaca la diferencia encontrada en la expresión de los genes de las enzimas detoxificadoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ascorbato peroxidasa y catalasas. Por ello,

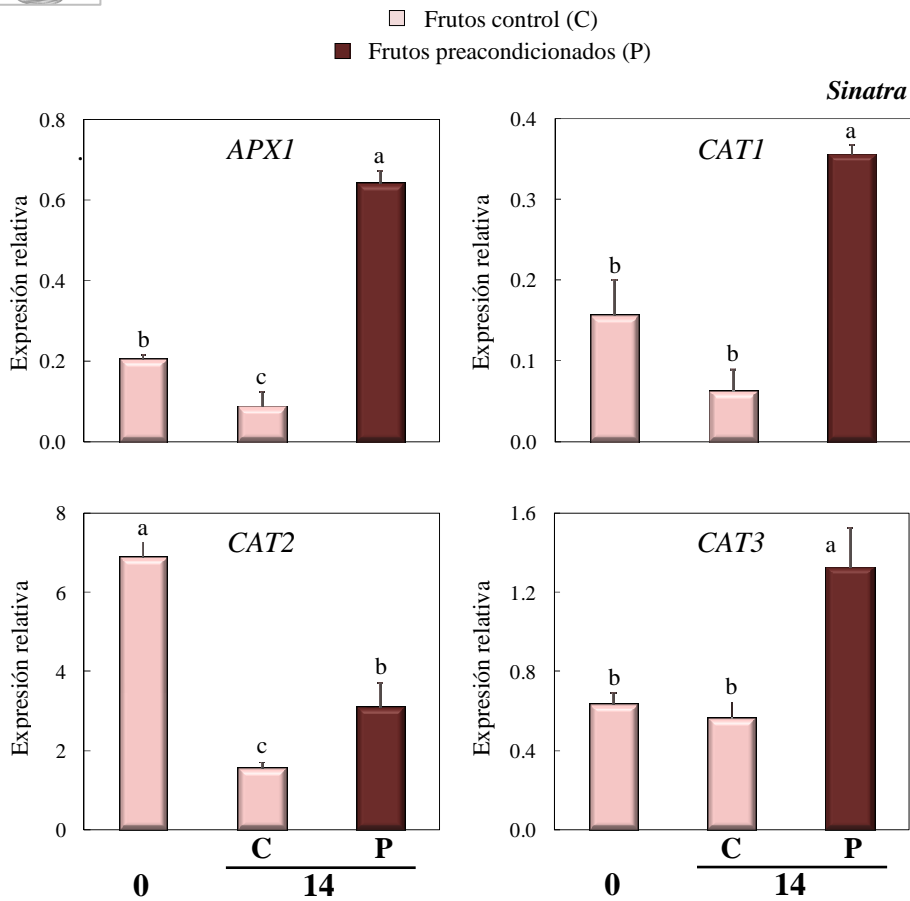


se han seleccionado estos genes para realizar el estudio de su expresión mediante RT-PCR cuantitativa cuyos datos se representan en la Figura 4.4.21



**Figura 4.4.20.** Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa del efecto del preconditionamiento sobre la expresión de distintos genes relacionados con la defensa antioxidante en el exocarpo de frutos de calabacín de la variedad Sinatra conservados 14 días a 4°C.

La expresión de *APXI*, *CAT1* y *CAT3* en el exocarpo de los frutos aumenta de forma significativa con el tratamiento tanto si comparamos los valores con los obtenidos en frutos recién cosechados como en los frutos control. *CAT2*, sin embargo, disminuye su expresión con el almacenamiento en frío tanto en frutos tratados como en frutos sin tratar, aunque los niveles encontrados en los frutos preconditionados son significativamente mayores.



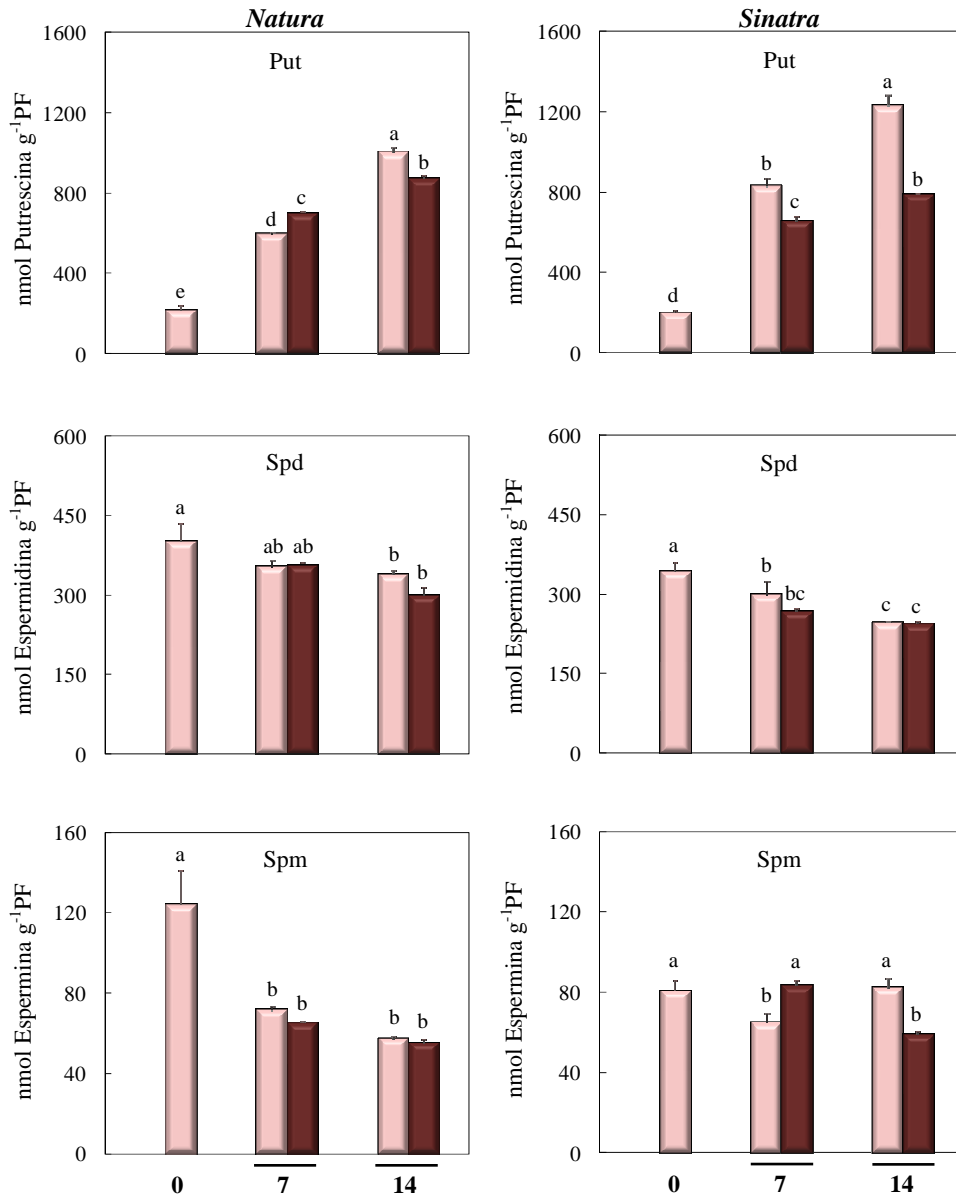
**Figura 4.4.21.** Análisis mediante RT-PCR cuantitativa del efecto del preconditionamiento sobre la expresión de los genes *APX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* en el exocarpo de frutos de la variedad Sinatra conservados durante 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4. Efecto del tratamiento de preconditionamiento sobre reguladores del crecimiento y metabolitos relacionados con el estrés

##### a) Poliaminas

La Figura 4.4.22 recoge los datos que se obtuvieron al cuantificar las poliaminas putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm).





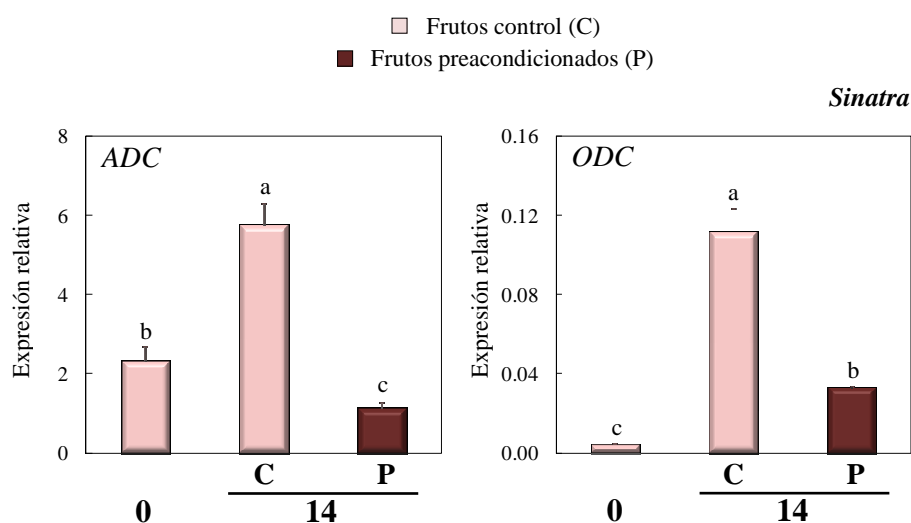
**Figura 4.4.22.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre el contenido en las poliaminas putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) de exocarpo de frutos *Natura* y *Sinatra* conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ). □ Frutos control ■ Frutos preacondicionados.



El contenido en Put aumentó con el almacenamiento en frío en los frutos de las dos variedades. En los frutos preacondicionados tanto Natura como Sinatra, el incremento en Put fue menor. Los niveles de Spd y Spm bajaron durante la conservación a 4°C en los frutos Natura y Sinatra preacondicionados y control.

### b) Expresión de *CpADC1* y *CpODC1*

En nuestro laboratorio, se han obtenido los ADNc parciales de una posible ADC (*CpADC1*, KF880789) y una ODC (*CpODC1*, KF880790) a partir de ARN de exocarpo de calabacín. Su expresión en el exocarpo de los frutos Sinatra se analizó mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 4.4.23). En los frutos control se produce un incremento significativo en la expresión tanto de *CpADC1* como *CpODC1* tras 14 días de frío. Los frutos preacondicionados, en cambio, disminuyen la expresión de *CpADC1* respecto al nivel inicial. La transcripción de *CpODC1* aumenta en los frutos preacondicionados pero el incremento es menor que en los frutos control.

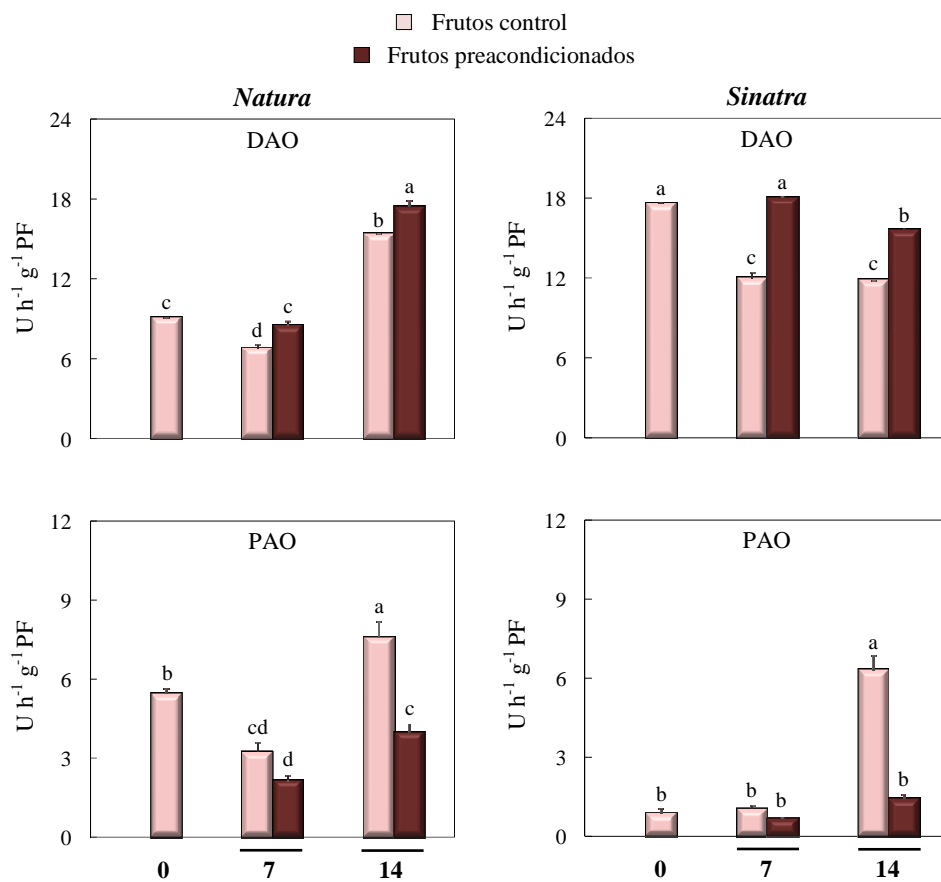


**Figura 4.4.23.** Análisis mediante RT-PCR cuantitativa del efecto del preacondicionamiento sobre la expresión de *CpADC1* y *CpODC1* en el exocarpo de frutos Sinatra conservados durante 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).



**c) Actividades DAO y PAO**

Los datos que se obtuvieron en la actividad de las enzimas responsables del catabolismo de poliaminas DAO y PAO se representan en la Figura 4.4.24. Los frutos precondicionados Natura y Sinatra mostraron una actividad DAO significativamente mayor que sus respectivos controles. Sin embargo, la actividad PAO presentó una tendencia contraria, siendo menor en los frutos precondicionados.

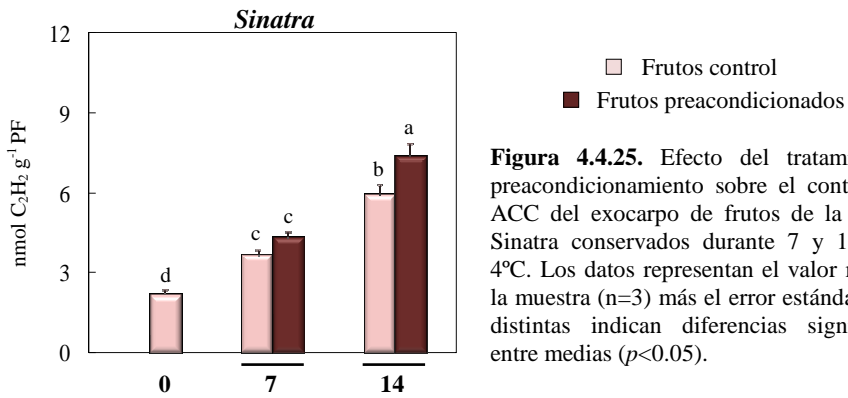


**Figura 4.4.24.** Efecto del tratamiento de precondicionamiento sobre las actividades enzimáticas diamino oxidasa (DAO) y poliamino oxidasa (PAO) en el exocarpo de frutos Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

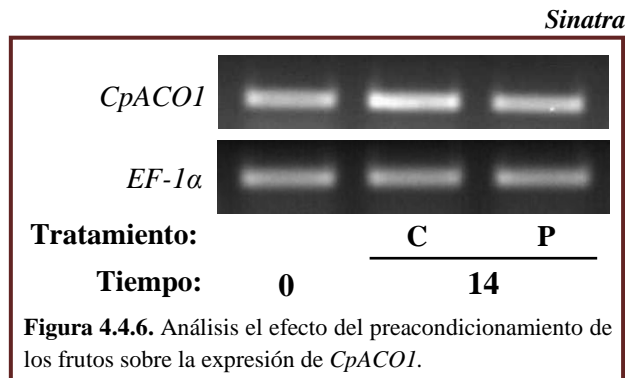


**d) Contenido en ACC y expresión de *CpACO1***

En el exocarpo de frutos de la variedad Sinatra preconditionados y control, se cuantificó el nivel de ACC así como la expresión del ARNm de la enzima de formación de etileno ACC oxidasa, *CpACO1* (Figuras 4.4.25 y 4.4.26). El ACC aumentó más con el preconditionamiento de los frutos, mientras que la expresión del transcrito de la ACC oxidasa fue mayor en los frutos control.



**Figura 4.4.25.** Efecto del tratamiento de preconditionamiento sobre el contenido en ACC del exocarpo de frutos de la variedad Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).

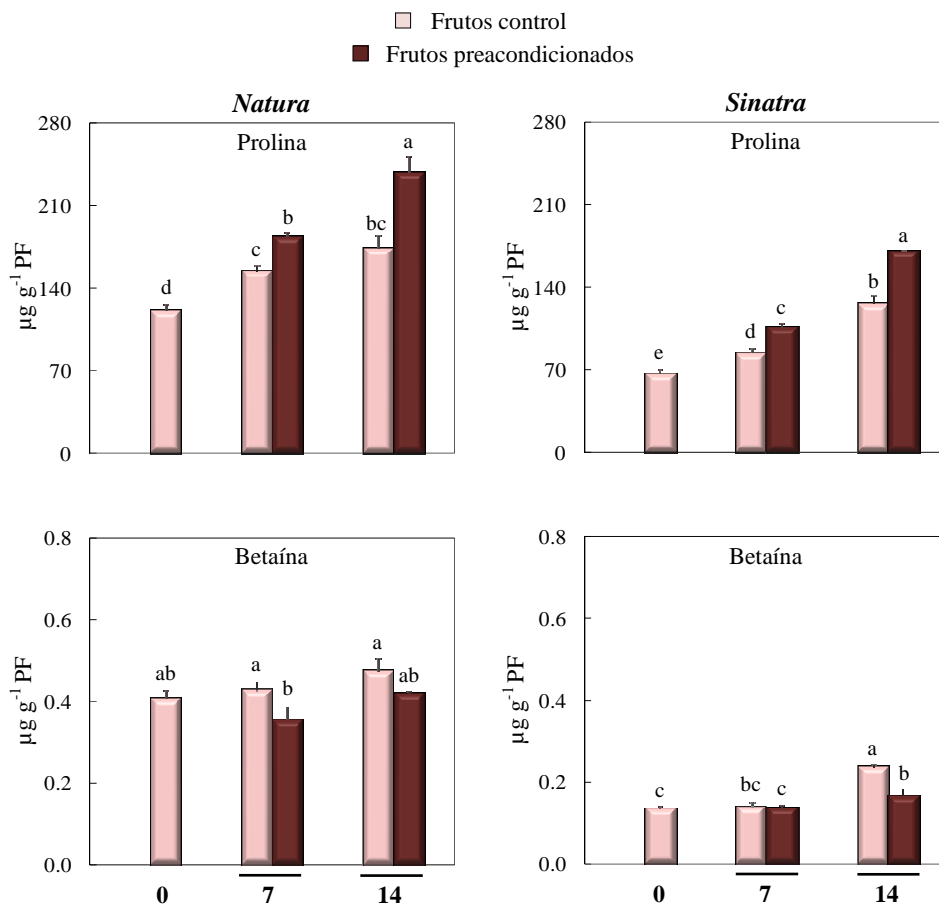


**Figura 4.4.6.** Análisis el efecto del preconditionamiento de los frutos sobre la expresión de *CpACO1*.



**e) Prolina y betaína**

La Figura 4.4.26 recoge los valores resultantes de la cuantificación de la prolina y la betaína. La prolina se acumuló en los frutos Natura y Sinatra con el almacenaje a 4°C. El tratamiento de preacondicionamiento resultó en un mayor aumento del contenido de este aminoácido en los frutos, mayor a 14 días, tanto en Natura como en Sinatra. Por el contrario, para la betaína se detectó una menor cantidad en los frutos preacondicionados.

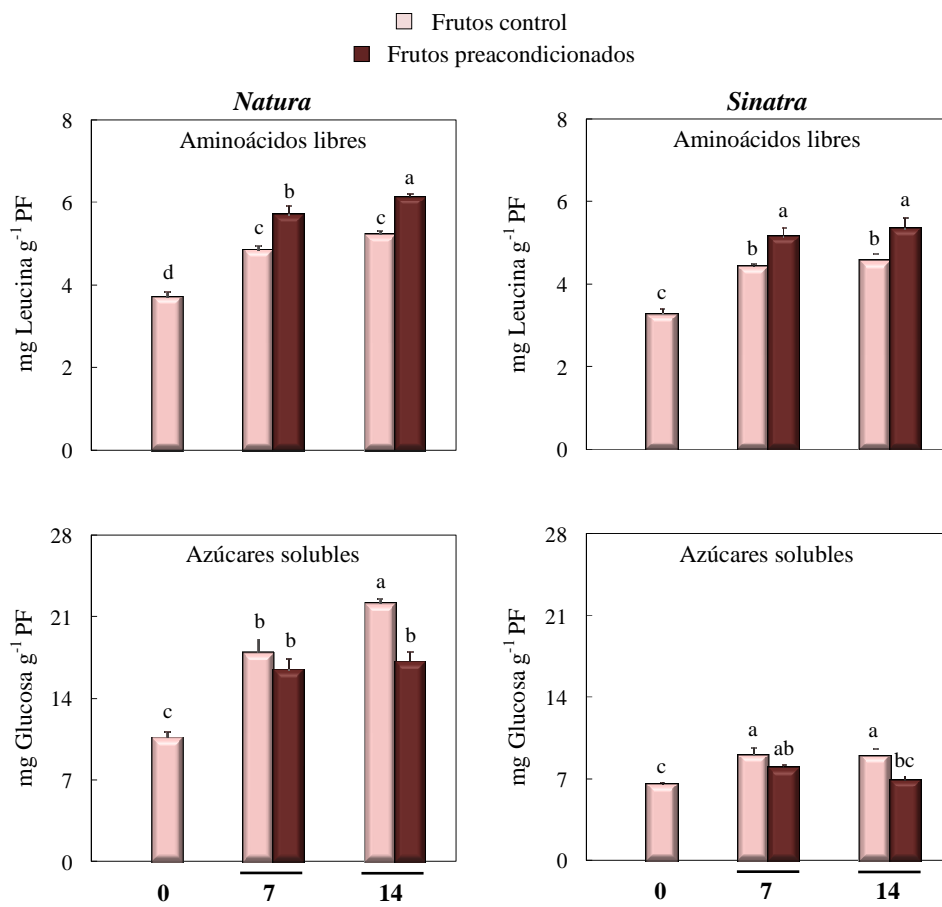


**Figura 4.4.26.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre el contenido en prolina y betaína en el exocarpo de frutos Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).



### f) Aminoácidos libres y azúcares solubles totales

Los datos de la cuantificación de los aminoácidos libres y los azúcares solubles totales se muestran en la Figura 4.4.27. Los frutos precondicionados de ambas variedades contenían más aminoácidos libres. Por el contrario, el precondicionamiento disminuyó los azúcares solubles totales de los frutos Natura y Sinatra respecto a los frutos control.

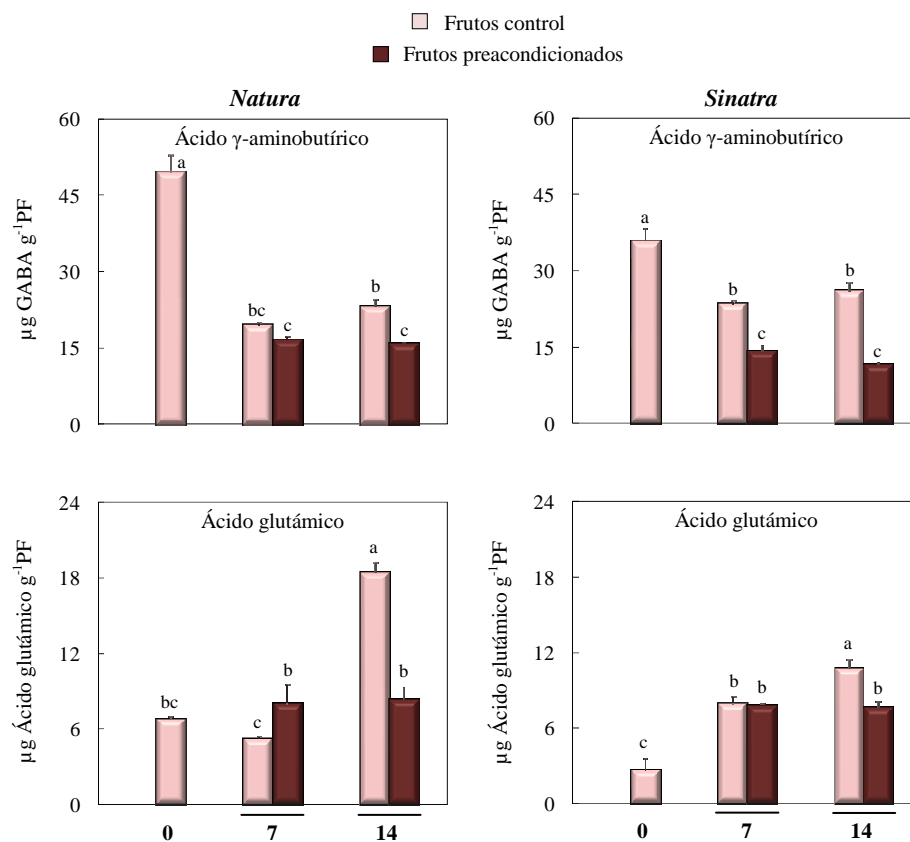


**Figura 4.4.27.** Efecto del tratamiento de precondicionamiento sobre el contenido en aminoácidos libres y azúcares solubles en el exocarpo de frutos Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).



**g) Ácidos  $\gamma$ -aminobutírico y glutámico**

La Figura 4.4.28 recoge los datos resultantes de la cuantificación de los ácidos glutámico y  $\gamma$ -aminobutírico. La tendencia de ambos con el almacenaje en frío encontrada en los frutos preacondicionados fue opuesta. Mientras que el GABA disminuye más con el preacondicionamiento el glutámico aumenta más que en los frutos control.

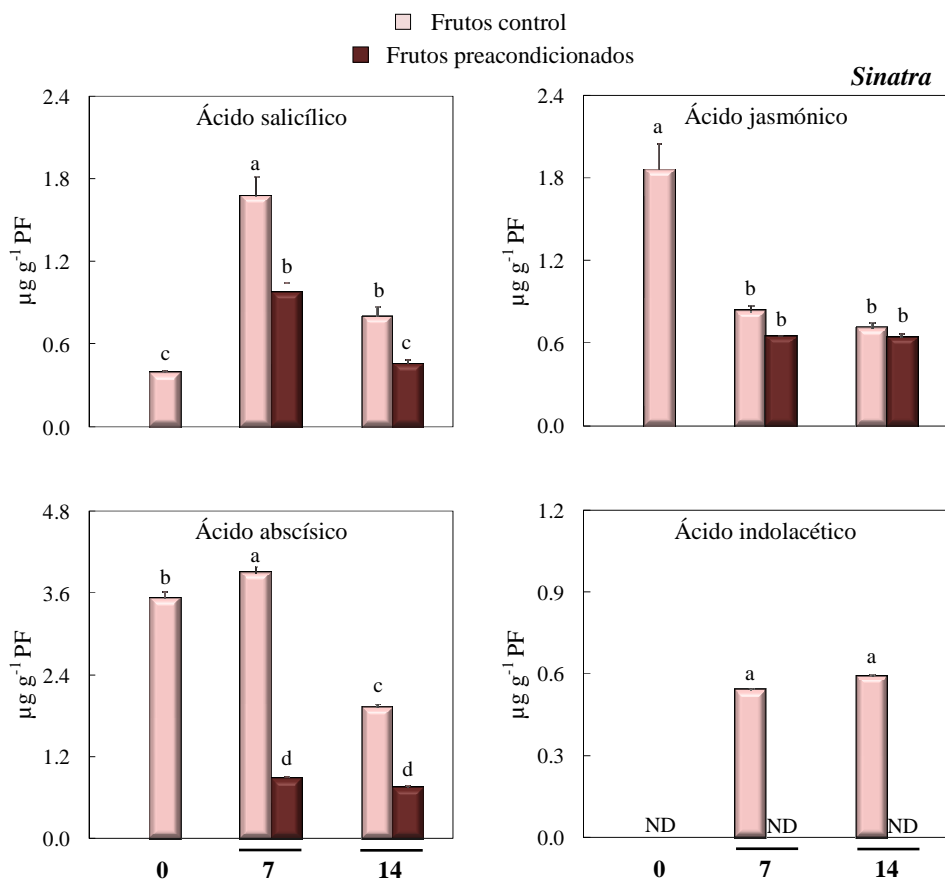


**Figura 4.4.27.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre el contenido en ácido  $\gamma$ -aminobutírico y ácido glutámico en exocarpo de frutos de calabacín Natura y Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).



### h) Otras fitohormonas

Se midieron los niveles de ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ), ácido abscísico (ABA) u ácido indolacético (AIA) en los frutos de la variedad Sinatra. Encontramos diferencias significativas en AS, ABA y AIA con el preacondicionamiento, presentando estos frutos un contenido menor que los control. El tratamiento no afectó al contenido en AJ.



**Figura 4.4.28.** Efecto del tratamiento de preacondicionamiento sobre el contenido de ácido salicílico, jasmónico, abscísico e indolacético en el exocarpo de frutos Sinatra conservados durante 7 y 14 días a 4°C. Los datos representan el valor medio de la muestra (n=3) más el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ( $p < 0.05$ ).



## **5.DISCUSIÓN**







## 5.1. Comportamiento postcosecha de los frutos de calabacín

Se ha estudiado la evolución del fruto de calabacín desde el momento en que es cosechado, y durante un tiempo de almacenamiento de hasta 14 días, a 20°C, 12°C y 4°C. Como medida de la calidad se ha estudiado la pérdida de peso, pérdida de electrolitos, textura y daños por frío (DF). La mayor pérdida de agua, medida como pérdida de peso, se produjo en los frutos almacenados a 20°C, debido a que a esta temperatura los procesos metabólicos del fruto se encuentran activos, existiendo una gran actividad respiratoria. Esta mayor pérdida de agua dio lugar, en algunos casos, a síntomas severos de deshidratación. Los frutos conservados a 12°C perdieron menos peso y mantuvieron una apariencia similar a la de los frutos recién cosechados. A 4°C, se registraron pérdidas de agua intermedias pero los frutos sufrieron un rápido deterioro en los primeros días de almacenaje debido al desarrollo de DF. El estudio de la textura de los frutos no permitió relacionar los cambios de ésta con el grado de sensibilidad al frío de las distintas variedades, por lo que este parámetro no ha sido tenido en cuenta para posteriores estudios. Otros parámetros que han servido para medir la severidad del estrés en frutos tras la postcosecha han sido el contenido en peróxido, la peroxidación lipídica (MDA) y la pérdida de electrolitos, ambas indicativas de los daños en membranas.

Con objeto de identificar la variabilidad existente en la respuesta al frío en frutos de calabacín, se analizó el comportamiento postcosecha de distintas variedades comerciales que son cultivadas en la provincia de Almería. Los análisis varietales se han realizado en distintas épocas de cosecha y también algunos se han realizado en distintos años. En todos los casos hemos podido destacar entre todas una variedad más tolerante, la variedad Natura, y entre las más sensibles hemos seleccionado las variedades Milenio y Sinatra. Los frutos de la variedad Natura presentaron menos pérdida de peso junto con una menor incidencia de los DF, mientras que Milenio y Sinatra fueron las más afectadas. Hasta la publicación de los resultados obtenidos de los análisis varietales (Carvajal y cols., 2011), no se habían descrito diferencias genotípicas en la susceptibilidad al frío en calabacín. La importancia del componente genético en la susceptibilidad al frío ha sido puesta de manifiesto en muchos frutos tropicales y subtropicales. Hakim y cols. (1999) encuentran para distintas



variedades en frutos de pepino que la severidad de cada parámetro indicativo de daño dependía de la variedad.

Muchos tratamientos previos a la conservación son efectivos en la reducción de la aparición de DF en muchas especies de origen tropical y subtropical. En el caso del calabacín, hemos realizado distintos tratamientos previos a la frigoconservación para estudiar su efecto sobre frutos de variedades comerciales con distinto grado de tolerancia al frío. Los tratamientos aplicados incluyeron tanto químicos como físicos. Los tratamientos químicos consistieron en la aplicación de distintas concentraciones de etileno (ET), 1-metilciclopropeno (1-MCP), jasmonato de metilo (MeJA), putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm). Los tratamientos físicos aplicados fueron adaptados de los descritos por Wang (1994) y consistieron en tratamientos térmicos, preacondicionamientos y la combinación de ambos.

De los tratamientos químicos, sólo la aplicación exógena de PAs mejoró la conservación de los frutos en frío. El tratamiento con Put fue el que tuvo un mayor efecto, reduciendo la pérdida de peso y la incidencia de DF. En frutos de calabacín, Martínez-Téllez y cols. (2002) habían descrito la eficacia de los tratamientos con PAs en la mejora de la postcosecha en frío. En su caso, la Spd fue la PA con la que se obtuvieron mejores resultados. En algunos trabajos realizados en frutos de calabacín, el tratamiento con MeJA también había tenido efecto positivo disminuyendo los DF (Wang y Buta, 1994; Wang y Buta, 1999). Sin embargo, en nuestros ensayos, el MeJA no mejoró la respuesta al frío de los frutos. Las mejoras encontradas en el efecto de los tratamientos previamente descritos por otros autores podrían deberse a que la respuesta de los frutos es dependiente de la variedad analizada.

Los frutos tratados térmicamente (30min 42°C) y preacondicionados (48h 15°C) aumentaron su tolerancia al frío, presentando menos DF, reducida pérdida de electrolitos, menor peroxidación lipídica y bajos niveles de peróxido respecto a los frutos control. El tratamiento que combinaba ambos (30min 42°C + 48h 15°C) resultó en una pérdida de calidad de los frutos. Previamente, Wang (1994) había descrito el mejor resultado con la aplicación este tratamiento combinado, discrepancia que podría deberse a la variedad estudiada en cada trabajo.



En el caso del tratamiento térmico, la respuesta de los frutos puede estar relacionada con la acumulación de proteínas de choque térmico (HSPs) al igual que ocurre en muchos otros frutos (Zhang y cols., 2005; Polenta y cols., 2007; Sevillano y cols., 2010). En los frutos tratados con calor se pudo detectar acumulación de smHSP y HSP70. Esta respuesta fue específica de los frutos tratados térmicamente, pudiendo estar relacionada con los mecanismos de tolerancia al frío adquiridos mediante la aplicación de este tratamiento.

De todos los tratamientos analizados, en nuestros resultados el preacondicionamiento de los frutos a una temperatura moderada (48h a 15°C) fue el más efectivo, al prolongar la vida comercial y reducir los DF. Por ello, se decidió realizar un estudio en profundidad de los cambios que dicho tratamiento provoca en la fisiología del fruto, con el objeto relacionar algunos de estos cambios con la tolerancia al frío y la mejora de la postcosecha. El efecto beneficioso de este tipo de tratamientos se ha descrito en distintos frutos de origen tropical y subtropical susceptibles a desarrollar DF. Ejemplo de ello son los resultados obtenidos en frutos de aguacate (Woolf y cols., 2003), níspero (Cai y cols., 2006), kiwi (Yang y cols., 2013a) y pomelo (Sapitnitskaya y cols., 2006; Maul y cols., 2008; Maul y cols., 2011; Chaudhary y cols., 2014).

## 5.2. Análisis histológico de los daños por frío

El exocarpo de los frutos de calabacín recién cosechados presenta una estructura bien definida. Está constituido por una epidermis y varias capas de células fotosintéticas. La epidermis está formada por una única capa de células de morfología rectangular cubiertas por una cutícula continua. Debajo de la misma, se encuentran una serie de capas de células fotosintéticas en las que se pueden observar numerosos cloroplastos. A continuación, se encuentran las células que constituyen el mesocarpo, de mayor tamaño y con una vacuola que ocupa gran parte del volumen celular. Pasados 14 días a 4°C, en las zonas del exocarpo que han desarrollado daños por frío (DF) se observan importantes alteraciones anatómicas. El exocarpo se presenta sin ninguna organización, las células que lo integraban inicialmente han colapsado y no se distinguen fácilmente. En mandarinas, se ha descrito una morfología similar en los frutos que presentaban síntomas severos de DF pre y postcosecha (Vercher y cols.,



1994; Medeira y cols., 1999). Estos autores relacionan estas alteraciones con la importante pérdida de agua sufrida por estos frutos que se relaciona también con el aumento de la permeabilidad de la cutícula. Otros desórdenes fisiológicos que se producen en cítricos y que se manifiestan con picado de la superficie también se han asociado con cambios en la humedad relativa que conllevan una mayor pérdida de agua (Agustí y cols., 2001; Alférez y Burns, 2004; Alférez y cols., 2010; Alquézar y cols., 2010; Alférez y Zacarías, 2013).

El mesocarpo también presenta cierto grado de deterioro debido al almacenamiento en frío de los frutos. Las células que lo constituyen pasan de ser isodiamétricas y con un contorno regular a adoptar una forma irregular. Cambios morfológicos similares se han asociado con el desarrollo de texturas anómalas causadas por la frigoconservación en frutos de hueso como melocotón (Luza y cols., 1992; Brovelli y cols., 1998). Al igual que en estos casos, la morfología adquirida por las células del mesocarpo podría ser atribuida a las alteraciones que se producen en las paredes celulares durante la exposición al frío. El picado de la superficie del fruto que se produce en cítricos también afecta a los tejidos y se ha podido relacionar con alteraciones que se producen en las paredes celulares (Cajuste y cols., 2011; Vicente y cols., 2013).

### 5.3. Cambios en las membranas

Las bajas temperaturas inducen cambios en la fase hidrofóbica de las membranas pasando de un estado de fluido a líquido-cristalino a una fase de sólido-gel. Como consecuencia, se produce una pérdida de integridad de las membranas dando lugar tanto a una salida de iones (Lyons, 1973). Por ello, la pérdida de electrolitos se considera un parámetro indicativo de la integridad de las membranas (Marangoni y cols., 1996), y ha sido utilizada para evaluar la efectividad que tienen distintos tratamientos sobre la mejora de la tolerancia al frío en distintas especies (Lafuente y cols., 1991; Martínez-Téllez y cols., 2002; Yang y cols., 2013b). La frigoconservación induce la pérdida de electrolitos en los frutos de calabacín, y esto se puede relacionar con la calidad del fruto, ya que los frutos más tolerantes de *Natura* presentan una menor pérdida que los de la variedad más sensible *Sinatra* o *Milenio*. Es importante resaltar que en ambas variedades el tratamiento de preacondicionamiento a 15°C indujo una reducción



en este parámetro. El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, considerándose en plantas como un marcador de la sensibilidad al frío (Alonso y cols., 1997; Queiroz y cols., 1998; Campos y cols., 2003). Este parámetro mostró la misma tendencia entre variedades que la pérdida de electrolitos: los frutos de las variedades más sensibles, como Sinatra y Milenio, aumentaron esta peroxidación lipídica con el almacenaje en frío mientras que en Natura el incremento fue menor. Al igual que pasó con la pérdida de electrolitos, el preacondicionamiento de los frutos redujo la peroxidación de lípidos, indicando una mayor resistencia al estrés por frío. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en el caso del fruto de calabacín, la pérdida de electrolitos y la peroxidación lipídica puede ser unos buenos marcadores de la sensibilidad al frío.

El catabolismo de lípidos de membrana también se ha asociado a un incremento en daños por frío, como sucede en pepino, con un aumento de actividad de las enzimas lipasas y oxigenasas (Mao y cols., 2007b; Mao y cols., 2007c). En nuestro caso, la actividad de las enzimas PLC, PLD y LOX fue mayor en los frutos de Sinatra durante la frigoconservación. Sin embargo, el frío provocó un aumento de la expresión del transcrito *CpPLDI* en Natura y una disminución en Sinatra. El preacondicionamiento no produjo cambios ni en la actividad LOX ni en los niveles de *CpPLDI*. Los resultados obtenidos en Natura y en los frutos Sinatra control y preacondicionados no relacionan la expresión de *CpPLDI* con la susceptibilidad al frío de los frutos. Las PLD pertenecen a familias multigénicas. Por ejemplo, se han descrito 12 genes en *Arabidopsis* (Qin y Wang, 2002), 17 en arroz (McGee y cols., 2003), 18 en soja (Zhao y cols., 2012), 18 en álamo y 11 en uva (Liu y cols., 2010). Aunque la secuencia parcial que se ha obtenido (*CpPLDI*) presenta una elevada homología con una PLD de pepino que se induce por el frío (Mao y cols., 2007a; Mao y cols., 2007b), en nuestro caso, *CpPLDI* podría codificar para otra lipasa responsable de otras funciones metabólicas o de la respuesta a otros tipos de estrés.

La postcosecha de frutos induce en muchas especies una pérdida de energía metabólica, que se refleja en una disminución en los niveles de ATP (Veltman y cols., 2003; Yi y cols., 2008; Yi y cols., 2010; Chen y Yang, 2013). En este trabajo, se han determinado los contenidos de ATP, ADP y AMP



durante la frigoconservación de los frutos. Tanto en la variedad resistente Natura como en la sensible Sinatra el almacenaje induce una disminución del estatus energético, aunque esta disminución es menor en Natura, más tolerante, con un mayor nivel tanto de ATP como de carga energética. Con el preacondicionamiento, se produce un drástico incremento en los niveles de ATP, ADP y AMP. La carga energética y la ratio ATP/AMP no disminuyen con la postcosecha en frío de los frutos preacondicionados. Estos resultados coinciden con los encontrados en otros frutos tras la aplicación de tratamientos que aumentan la tolerancia al frío de los mismos (Yang y cols., 2011; Chen y Yang, 2013).

La composición de los lípidos de membrana tiene una gran importancia en el mantenimiento de la integridad de las mismas bajo condiciones de estrés por bajas temperaturas. Un mayor contenido en ácidos grasos insaturados permite una mayor fluidez de las membranas haciendo que éstas sean menos susceptibles al frío (Murata y cols., 1982; Nishida y Murata, 1996; Murata y Los, 1997). Por ello, se determinó el contenido en ácidos grasos del exocarpo de los frutos con objeto de identificar posibles variaciones en el contenido y en el grado de insaturación de los ácidos grasos durante la postcosecha. En el exocarpo de los frutos Natura y Sinatra tiene lugar una disminución de los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico cuando son almacenados a 4°C. De los dos ácidos grasos insaturados detectados, el ácido linoleico disminuye con el frío mientras que el linolénico aumenta en ambas variedades. La disminución del linoleico es menor en Natura y el incremento del linolénico es mayor. El tratamiento de preacondicionamiento 48h 15°C produjo en el exocarpo del fruto un importante incremento en los niveles de ácidos grasos, tanto globales como individuales. El incremento observado en los ácidos grasos insaturados linoleico y linolénico puede estar relacionado con la adaptación de los frutos preacondicionados a las bajas temperaturas, como se ha descrito que ocurre con otros tratamientos en níspero (Cao y cols., 2009a; Cao y cols., 2009b; Rui y cols., 2010). Durante el almacenaje en frío de frutos de melocotón, el aumento del ácido linolénico también se relaciona con la menor incidencia de DF (Zhang y Tian, 2009; Zhang y Tian, 2010). Sin embargo, junto con los ácidos grasos insaturados se detectó un aumento de los ácidos grasos saturados palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0). Estos ácidos grasos sirven como precursores de distintos componentes de la cutícula vegetal (Kunst y Samuels,





2009; Lara y cols., 2014), que es un material lipofílico que recubre las paredes y protege de la pérdida de agua. Un aumento en el contenido en ácidos palmítico y esteárico podría indicar un mayor desarrollo del grosor de las cutículas. Hemos estudiado a nivel microscópico la cutícula de los frutos control y preacondicionados. Aunque a microscopía óptica parecía existir una diferencia entre ambas, los estudios de microscopía electrónica de barrido y transmisión no pudieron corroborar dichos resultados, por lo que no podemos concluir que ese sea el destino del incremento en ácidos grasos saturados. Los ácidos grasos saturados podrían servir como sustrato de la síntesis de ácidos grasos insaturados o podrían servir como fuente de energía mediante  $\beta$ -oxidación. Los mayores niveles de ATP y carga energética pueden ser en parte debidos a ello.

Las enzimas desaturasas introducen dobles enlaces en las cadenas de ácidos grasos, modificando el perfil de los mismos y aumentando en muchas especies la tolerancia al frío (Kodama y cols., 1994; Ishizaki-Nishizawa y cols., 1996; Orlova y cols., 2003; Craig y cols., 2008). En relación con el incremento en el contenido de ácidos grasos insaturados que se produce en los frutos con el preacondicionamiento, se estudió la expresión de una desaturasa (*CpFAD2*) cuya secuencia se encuentra disponible en las bases de datos. Los resultados mostraron un aumento de expresión en los frutos preacondicionados, pudiendo ser responsable del aumento en los niveles de ácidos grasos insaturados. Sapitnitskaya y cols. (2006) también describieron esta misma respuesta como específica de este tratamiento en frutos de pomelo.

#### **5.4. Modificaciones de la pared celular**

Las enzimas poligalacturonasa (PG) y pectin metilesterasa (PME) se han relacionado con los cambios texturales que se producen en frutos almacenados en frío. Ambas fueron determinadas en los frutos de las variedades Milenio (sensible al frío) y Natura (más resistente al frío). La tendencia encontrada fue similar, sin embargo, el nivel de actividad en los frutos más sensibles de Milenio fue mayor. Por lo tanto, la diferencia en la actividad de los frutos recién cosechados podría estar relacionada con la mayor resistencia al frío. En frutos de calabacín almacenados a 2.5°C, han descrito un incremento la



actividad PG después de 12 días, correlacionada con el desarrollo de daños, al igual que lo observado en otras variedades de calabacín a 2,5°C (Balandrán-Quintana y cols., 2007). En tomate, la exposición de los frutos a baja temperatura reduce la expresión y actividad PG en comparación con los frutos control (Rugkong y cols., 2011). Van Dijk y cols. (2006) describen un descenso en la actividad PME en frutos de tomate almacenados a 3°C. La menor actividad de estas enzimas en frío en los casos descritos puede ser explicada por la disminución de la tasa metabólica debida a la baja temperatura.

### 5.5. Inducción de estrés oxidativo y defensa antioxidante

La acumulación de  $H_2O_2$  en células vegetales ha sido descrita como una consecuencia directa de la exposición a bajas temperaturas (MacRae y Ferguson, 1985; Okuda y cols., 1991; O'Kane y cols., 1996). En frutos de calabacín, hemos encontrado una correlación positiva entre los niveles de  $H_2O_2$  y el desarrollo de DF. Las variedades más sensibles incrementan su contenido en  $H_2O_2$  durante el almacenamiento a 4°C respecto a las tolerantes. El preacondicionamiento a 15°C durante 48 h reducen los DF en los frutos sensibles, a la vez que la cantidad de  $H_2O_2$  acumulada es menor. El contenido en  $H_2O_2$  es un reflejo de la actividad de las enzimas superóxido dismutasas (SOD), peroxidasas (POD), catalasas (CAT), junto con enzimas del ciclo ascorbato-glutatión.

En nuestras variedades la actividad SOD aumenta con la frigoconservación en el fruto. La respuesta fue similar en frutos Natura y Sinatra, no existiendo diferencias entre ambas variedades. El tratamiento de preacondicionamiento tampoco afectó significativamente a esta actividad enzimática. En los frutos Sinatra preacondicionados y control, la actividad SOD también se estudió en geles nativos de poliacrilamida, pudiéndose detectar distintas bandas que tampoco diferían con el preacondicionamiento. Mediante la incubación con los inhibidores específicos  $CN^-$  y/o  $H_2O_2$  se identificaron como Mn-SOD y Cu/Zn-SOD. Al igual que en otras especies de la misma familia no pudo detectarse actividad Fe-SOD (Bridges y Salin, 1981; Lee y Lee, 2000; Choi y cols., 2002; Kuk y cols., 2003). En calabacín, otros autores han medido un incremento en la actividad SOD con distintos tratamientos que mejoran la



respuesta al frío (Wang, 1995a; Zheng y cols., 2008). Según estos autores la inducción de la actividad SOD se produce en los primeros días de almacenamiento, disminuyen o posteriormente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Qian y cols. (2013) en pepino, donde en los estadios de desarrollo más susceptibles la SOD aumenta en los primeros días de exposición al estrés. En nuestro caso, las determinaciones se realizaron en frutos almacenados durante intervalos de tiempo superiores, por los que en el caso de producirse cambios con el tratamiento, tal vez éstos no fueron detectados. En otros frutos, como pomelo, la expresión SOD no se ve afectada por el preacondicionamiento (Maul y cols., 2011).

La actividad peroxidasa puede relacionarse por un lado con la defensa antioxidante, por su capacidad de detoxificación del  $H_2O_2$  y por otro con las reacciones de pardeamiento enzimático, junto con la polifenol oxidasa. Entre las distintas variedades analizadas no se encontró relación entre la actividad POD total y los DF, teniendo lugar a 4°C un drástico incremento de la misma en todos los frutos de todas las variedades. Raimbault y cols. (2010), estudiando la actividad de esta enzima en distintas variedades de piña, tampoco encontraron relación con los daños producidos por el frío en los frutos de las variedades más sensibles. En los frutos de la variedad menos tolerante Sinatra, el tratamiento de preacondicionamiento indujo un aumento de esta actividad, posiblemente contribuyendo a la eliminación del  $H_2O_2$ . Este tipo de tratamiento tiene el mismo efecto sobre la actividad POD en kiwis y naranjas, relacionándose con la menor incidencia de DF (Bassal y El-Hamahmy, 2011; Yang y cols., 2013a).

La actividad catalasa juega un importante papel en la ruptura del  $H_2O_2$  en las células vegetales bajo condiciones de estrés (Willekens y cols., 1995; Mhamdi y cols., 2010). En el caso del calabacín, la actividad CAT del exocarpo se correlacionó negativamente con los DF, presentando la variedad Natura una actividad CAT mayor que la sensible Sinatra. En los frutos preacondicionados, esta actividad también fue más elevada tanto en la variedad sensible como en la tolerante. Con respecto a los niveles de transcritos de catalasas en frutos, hemos analizado tres ADNc, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*, encontrando diferencias en la transcripción de cada uno de ellos, y también en diferencias dependiendo de la variedad. *CAT1* aumentó con el frío en Natura, mientras que en Sinatra disminuyó. La expresión de *CAT2* se redujo con el frío en ambas variedades.



*CAT3* disminuyó en Natura y no cambió en Sinatra. Con el preacondicionamiento, en los frutos de Sinatra se produjo un incremento en la expresión de las tres catalasas, correlacionándose con el aumento de actividad e indicando una regulación de la misma a nivel transcripcional. La enzima APX tiene una gran importancia en la detoxificación del  $H_2O_2$ . En los frutos Natura fue mayor que en los Sinatra, sin embargo, las diferencias más destacadas se encontraron con el preacondicionamiento de los frutos. La actividad APX también ha sido estudiada en geles en los frutos Sinatra preacondicionados y control. La tinción específica reveló distintas bandas cuyo comportamiento cambió en función de las muestras analizadas. Varias isoformas aumentaron su actividad en los frutos preacondicionados de la misma forma que en los resultados descritos para esta actividad enzimática en los ensayos *in vitro*. Estos resultados coinciden con la tendencia a 4°C, la expresión de *CpAPX1* analizada reveló resultados similares a los encontrados en la actividad enzimática, existiendo más acumulación de ARNm en Natura que en Sinatra y siendo mayor con el preacondicionamiento en estos últimos. Este tipo de tratamiento se ha asociado con una mayor actividad y expresión de CATs y APXs (Wang, 1995a; Wang, 1996; Bassal y El-Hamahmy, 2011; Maul y cols., 2011; Yang y cols., 2013a).

La actividad monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) fue mayor en los frutos Natura, mientras que la deshidroascorbato reductasa (DHAR) no presentó diferencias entre variedades. Con el preacondicionamiento, las dos variedades estudiadas mostraron una tendencia opuesta. En los frutos Natura ambas actividades aumentaron en respuesta al tratamiento, mientras que en la variedad Sinatra tuvo lugar una disminución de la actividad en los frutos tratados. Los resultados obtenidos por Wang (1996) coinciden con la tendencia encontrada en los frutos Natura. En tomate, se ha relacionado la tolerancia al frío con una mayor actividad MDHAR (Stevens y cols., 2008; El Airaj y cols., 2013), asemejándose a la respuesta de los frutos Natura. La actividad glutatión reductasa (GR) disminuyó con el frío en los frutos Natura mientras que en los Sinatra aumentó. El tratamiento de preacondicionamiento también redujo significativamente los niveles de esta enzima. Los resultados obtenidos por Wang (1995b) son similares a los de los frutos Natura, mientras que el efecto del tratamiento incrementó los niveles de GR. La diversidad encontrada en estas



actividades enzimáticas en frutos de calabacín indica que la respuesta de los mismos es dependiente de la variedad analizada, entre otros factores.

El estudio de la expresión los genes de una oxidasa alternativa (*AOX*), una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PDH*) y de las enzimas málico dependientes de  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  (*NAD-ME* y *NADP-ME*) reveló una mayor expresión *G6PDH* en los frutos Natura conservados en frío que en los Sinatra. La tendencia de que presentó la transcripción de *AOX* fue opuesta, en Natura aumentó con el frío y en Sinatra se redujo. El preacondicionamiento realizado en los frutos Sinatra indujo la expresión de los genes estudiados. La mejora de la postcosecha en frío de chirimoyas y fresas tratadas con  $\text{CO}_2$  ha sido relacionada con un aumento de la actividad *NADP-ME* (Maldonado y cols., 2004; Blanch y cols., 2013). También se han detectado incrementos de expresión de la *AOX* en frutos de calabacín y pimiento con distintos tratamientos de mejora de la postcosecha en frío (Fung y cols., 2004; Fung y cols., 2006; Zheng y cols., 2008).

Del estudio realizado con las enzimas antioxidantes en calabacín, es en las actividades *APX* y *CAT* en las que se detecta una mejor correlación con la tolerancia, en todas las variedades y tratamientos. Los resultados presentados en este trabajo, junto con los obtenidos por otros autores, sugieren que la respuesta de las demás enzimas antioxidantes estudiadas es dependiente de la variedad. Los tratamientos que reducen los DF podrían mejorar la defensa antioxidante aumentando la actividad de muchas de las enzimas implicadas en la misma. El preacondicionamiento en frutos de kiwi incrementa las actividades *APX*, *CAT*, *SOD* y *POD* (Yang y cols., 2013b). Lo mismo ocurre con los tratamientos con *MeJA* y *1-MCP* en frutos de níspero (Cao y cols., 2009a; Cao y cols., 2009b; Cai y cols., 2011) así como cuando se utiliza un tratamiento térmico combinado con ácido salicílico en melocotón (Cao y cols., 2010). Sin embargo en otros casos, los tratamientos inducen cambios sólo en algunas de las enzimas involucradas en la defensa antioxidante. En mandarina, el etileno indujo las actividades fenilalanina amonio-liasa y *CAT*, mientras que *SOD* y *GR* no se vieron afectadas por el tratamiento (Lafuente y cols., 2004). De la misma forma, el tratamiento térmico en mandarina incrementó los niveles de las *APX*, *CAT* y *SOD*, mientras que disminuyó la actividad *GR* (Sala y Lafuente, 1999).



Un elevado contenido de ascorbato (AA) es importante para el mantenimiento del sistema antioxidante y la protección de las células vegetales frente al daño oxidativo (Shigeoka y cols., 2002). En nuestro caso, el contenido en AA aumentó en el exocarpo de los frutos durante el almacenaje en frío, siendo mayores los niveles alcanzados en Sinatra. Un resultado similar se observa en mango (Chongchatuporn y cols. (2013), donde la variedad con un mayor índice de DF presenta un mayor contenido de ascorbato. El preacondicionamiento incrementó el contenido en AA respecto a los frutos control. Este resultado podría estar relacionado con el aumento de la actividad APX, de forma que los frutos preacondicionados al tener una mayor actividad requieren una concentración más elevada de su sustrato reductor. El glutatión (GSH), en cambio, tiene una tendencia opuesta, siendo mayor en la variedad tolerante e igual o menor en los frutos preacondicionados dependiendo de la variedad. Esta diferencia entre AA y GSH podría ser debida a un mecanismo de compensación como el que ha sido sugerido en pepino y en otras especies sometidas a otros tipos de estrés (Hernández y cols., 2010; Qian y cols., 2013).

Relacionada con el metabolismo oxidativo de los frutos se encuentran el contenido en fenoles y la capacidad antioxidante total. Estos parámetros, además, presentan un gran interés desde un punto de vista nutricional (Wang y cols., 2011). En general, tanto los compuestos fenólicos como la capacidad antioxidante total de los frutos aumentaron con el almacenamiento en frío, aunque no se correlacionó con el desarrollo de daños. Esta tendencia ha sido descrita en numerosos frutos, pudiendo ser utilizada como herramienta para aumentar el contenido en compuestos bioactivos de muchos productos vegetales (Cisneros-Zevallos, 2003).

La actividad fenilalanina amonio-liasa (PAL) está relacionada con la defensa frente al estrés oxidativo generado por el frío. En frutos de calabacín, hemos visto que esta enzima disminuye con el frío aunque, en la variedad más sensible, los niveles son muy superiores, relacionándose con el alto contenido en fenoles totales. La expresión de *CpPAL1* mostró resultados similares a la actividad en Natura, mientras que en Sinatra sólo se detectó un leve incremento con el frío. La discrepancia encontrada entre actividad y expresión en los frutos Sinatra control puede deberse a una regulación postraducciona, el frío, por tanto inhibiría, la actividad enzimática. De igual forma, ha sido descrita una



mayor actividad y expresión PAL asociada al desarrollo de DF en frutos de distintas especies como naranjas, mandarinas, mangos y plátanos (Sánchez-Ballesta y cols., 2000b; Lafuente y cols., 2003; Nguyen y cols., 2003; Chidtragool y cols., 2011). El tratamiento de preacondicionamiento de los frutos Sinatra aumentó la expresión de *CpPAL1*. Distintos tratamientos postcosecha, incrementan la actividad de esta enzima. Es el caso de mandarinas y plátanos tratados con etileno y propileno (Lafuente y cols., 2004; Wang y cols., 2007), o con la aplicación un tratamiento térmico (Sánchez-Ballesta y cols., 2000a; Chen y cols., 2008).

El aumento de la actividad polifenol oxidasa (PPO) ha sido descrita como una respuesta común en frutos sensibles conservados en frío. Ejemplo de ello son los resultados obtenidos en las variedades más susceptibles de piña (Raimbault y cols., 2010). Resultados similares hemos obtenido en frutos de calabacín, donde la actividad PPO, analizada tanto *in vitro* como en geles de poliacrilamida, fue mayor en la variedad más sensible.

## 5.6. Implicación en la respuesta de los frutos de fitohormonas y reguladores del crecimiento

Se ha comparado el contenido en PAs durante la postcosecha de los frutos Natura y Sinatra. Coincidiendo con otros trabajos (Kramer y Wang, 1989; Serrano y cols., 1998), en el exocarpo se detectaron tres PAs: Put, Spd y Spm. Estos autores describen una acumulación de Put y una disminución de los niveles de Spd y Spm durante el almacenamiento en frío de frutos de calabacín. Los resultados presentados en esta memoria muestran un comportamiento similar. La diferencia encontrada entre los frutos de las dos variedades fue en los niveles de Put. Los frutos de la variedad más sensible contenían más Put que los de la más tolerante. McDonald y Kushad (1986) encontraron una correlación positiva entre el desarrollo de DF en limón, pomelo y pimiento y los niveles de Put. La conservación a 20°C disminuyó el contenido en PAs, pudiéndose relacionar con el proceso de senescencia de los frutos de forma similar a la descrita en frutos de otras especies como pimiento y melocotón (Yahia y cols., 2001; Liu y cols., 2006). El preacondicionamiento hizo que el aumento de los niveles de Put con el frío fuera significativamente menor, respuesta similar a la



encontrada en los frutos de la variedad más tolerante. Kramer y Wang (1989) describen un incremento en el contenido en Spd y Spm con el tratamiento de preacondicionamiento a los 10°C durante los primeros 5 días de almacenaje a 2.5°C. En nuestro caso, las PAs se analizaron a los 7 y 14 días por lo que no pudimos detectar ese cambios en Spd y Spm que se pudieran asociar con la tolerancia.

La síntesis de Put se produce mediante dos vías, siendo las enzimas arginina descarboxilasa (ADC) y ornitina descarboxilasa (ODC) las principales responsables de cada una de ellas. En frutos de calabacín, Kramer y Wang (1990) mostraron un aumento de la actividad ODC preacondicionados y control almacenados a 2.5°C, existiendo diferencias a partir de los 14 días. La actividad ADC no se vio afectada por el frío. En esta memoria, se estudió la expresión de los ADNc *CpADCI* y *CpODCI*, obtenidos en nuestro laboratorio, en los frutos Sinatra preacondicionados y control. Los resultados obtenidos para *CpODCI* coinciden con los descritos en la actividad enzimática, aumentando la transcripción con el frío y siendo menor con el preacondicionamiento. Sin embargo, también se produce un incremento de la expresión de *CpADCI* en los frutos control. En otros trabajos realizados en nuestro laboratorio, se ha visto un aumento de la actividad ADC a los 7 días de almacenaje a 4°C.

Previamente con los protocolos de extracción empleados, no se había podido detectar actividad de las enzimas responsables del catabolismo de PAs, DAO y PAO, en calabacín (Kramer y Wang, 1990). Estas enzimas se midieron en frutos Natura y Sinatra preacondicionados y control. La tendencia encontrada en la actividad DAO de los frutos control de ambas variedades fue opuesta. Mientras que en Natura aumenta con el frío, en Sinatra disminuye, indicado una mayor degradación de Put en los frutos de la variedad más tolerante. La PAO incrementó en las dos variedades, coincidiendo con los resultados de concentración en Spd y Spm que bajaba con el frío. El tratamiento de preacondicionamiento aumentó la DAO e hizo disminuir la PAO. El incremento de la actividad DAO también se relaciona con el menor contenido en Put que presentaban estos frutos, de forma similar a la descrita en la variedad más tolerante. Por el contrario, la bajada de la actividad PAO no se reflejó en un menor contenido en Spd y Spm. La degradación de Put tanto en Natura como en





los frutos preacondicionados podría asociarse con la producción de otros metabolitos relacionados con la tolerancia a condiciones de estrés.

La actividad de las enzimas DAO se puede relacionar con la producción de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). La respuesta más extendida a tratamientos que mejoran la calidad de los frutos conservados en frío es la acumulación de GABA (Merodio y cols., 1998; Cao y cols., 2012). Además, la aplicación exógena de GABA reduce los DF en frutos sensibles como plátano (Wang y cols., 2014) y melocotón (Shang y cols., 2011; Yang y cols., 2011). En frutos de calabacín, los niveles de GABA bajan con la frigoconservación, siendo mayor la disminución en los frutos más tolerantes al frío. El preacondicionamiento también reduce el contenido en GABA. De forma similar al resultado obtenido en calabacín, Luengwilai y cols. (2012) describen un descenso en los niveles de GABA en pericarpo de tomates tratados térmicamente y conservados en frío. En estos casos, el GABA puede estar siendo catabolizado para la generación de energía y poder reductor mediante el ciclo de Krebs. El ácido glutámico mostró una tendencia opuesta al GABA aumentando con la conservación en frío. El incremento fue mayor en Natura y menor en los frutos preacondicionados sólo después de 14 días a 4°C. Este aminoácido puede participar en distintos procesos entre los que se encuentran la síntesis de GABA y prolina. Por lo tanto, los cambios que se producen en los niveles del mismo durante la postcosecha en frío del calabacín pueden relacionarse con dichos procesos.

En relación con la producción de etileno, se ha medido el contenido en ACC y la expresión del gen *CpACOI* de calabacín, que corresponde a una ACC oxidasa. El contenido en ACC aumentó con el frío en los frutos Sinatra, mientras que en Natura los cambios no fueron significativos. La expresión de *CpACOI* aumentó con el frío en ambas variedades, siendo mucho menor en Natura que en Sinatra. La acumulación de ARNm de *CpACOI* fue menor en los frutos conservados a 20°C. Estos resultados indican una mayor producción de etileno en los frutos que desarrollan más DF, concordando con Megías y cols. (2014) que han descrito un aumento de la producción de etileno en los frutos de calabacín más sensibles. Los frutos Sinatra preacondicionados contenían más ACC que los frutos control. En cambio, la producción de etileno de los frutos preacondicionados es menor (Megías y cols., 2014). Esta acumulación de ACC puede ser explicada por los resultados encontrados en la expresión de la enzima



ACC oxidasa, que resultó menor en estos frutos. La menor expresión ACCO en los frutos preacondicionados también ha sido descrita por otros autores en pomelo (Maul y cols., 2008; Maul y cols., 2011).

Con respecto a la implicación del ácido salicílico (AS) y jasmónico (AJ) en el estrés por frío, estas hormonas no parecen implicadas en la respuesta de mayor tolerancia frente al frío en fruto de calabacín. En Natura, el AS no cambió con el almacenamiento en frío mientras que en Sinatra aumentó. Este incremento en los frutos de la variedad sensible puede deberse a un mecanismo de protección frente a los daños producidos. Se confirma con el resultado que encontramos preacondicionando los frutos de Sinatra, en dónde se observa una reducción en el contenido de esta fitohormona. Bajo condiciones de estrés por frío, se ha descrito una inhibición de la actividad catalasa con el AS (Shim y cols., 2003; Taşgin y cols., 2006). En calabacín, podría existir una relación semejante puesto que los frutos más sensibles presentan menor actividad catalasa y mayor contenido en AS. Tanto la tendencia como los niveles de AJ fueron similares en los frutos Natura y Sinatra disminuyendo con el almacenaje en frío. Además, el contenido de esta hormona no se vio afectado por el preacondicionamiento.

Las condiciones de estrés inducen la rápida síntesis *de novo* de ácido abscísico (ABA). La degradación de ABA es suprimida por el estrés mientras que se activa por el propio ABA y cuando las condiciones de estrés se alivian (Xiong y Zhu, 2003). El aumento detectado a los 7 días de almacenaje en frío fue mayor en los frutos de la variedad más tolerante al frío, sin embargo los frutos preacondicionados redujeron sus niveles de ABA. Estos resultados parecen indicar que en la tolerancia al frío de Natura puede intervenir el ABA mientras que la adquirida mediante el preacondicionamiento es independiente de ABA. Una respuesta similar fue encontrada por Serrano y cols. (1998) en frutos de calabacín tratados con CO<sub>2</sub> antes del almacenaje a 2°C que produce una disminución del ABA y un menor desarrollo de DF. Estos autores aducen que el aumento de ABA es consecuencia del estrés generado en los frutos y no debida a un mecanismo de defensa, haciéndola además responsable del aumento de los niveles de putrescina. El tratamiento de preacondicionamiento produjo la misma respuesta en kiwi, donde los frutos a los que se aplicó este tratamiento contenían menos ABA y AIA que los control (Yang y cols., 2013a).



### **5.7. Metabolitos relacionados con la respuesta al estrés durante la postcosecha de los frutos de calabacín**

El contenido en prolina (Pro) aumentó en el exocarpo de calabacín con la frigoconservación, siendo mayor el aumento en los frutos de la variedad menos sensible y en los preacondicionados. Estos resultados parecen indicar que los niveles de este aminoácido se relacionan con la mayor tolerancia al frío en calabacín. Una respuesta similar ha sido descrita en tomates, donde los frutos de la variedad resistente al frío mostraban un mayor contenido en Pro (Zhao y cols., 2009). Distintos tratamientos postcosecha dan lugar a la acumulación de Pro en tomate, melocotón y níspero (Zhang y cols., 2010; Shang y cols., 2011; Cao y cols., 2012) . En los niveles de betaína no encontramos diferencias entre variedades, pero sí con el preacondicionamiento. El tratamiento disminuyó el contenido en betaína respecto a los frutos control, respuesta contraria a la registrada en la Pro. La acumulación de otros aminoácidos ha sido descrita en plantas bajo condiciones de estrés por frío (Szalai y cols., 1997). Por lo que, además de los contenidos en Pro y betaína, también se determinaron los aminoácidos libres totales. En este caso, la tendencia de los mismos fue similar a la encontrada para la Pro, siendo los niveles superiores tanto en Natura como en los frutos preacondicionados.

Los azúcares solubles han sido relacionados con la adaptación de plantas y frutos a las bajas temperaturas. El análisis su contenido en frutos Natura y Sinatra mostró una mayor acumulación en los frutos más resistentes. En un estudio en profundidad del metabolismo de estos compuestos, hemos encontrado que en Natura el aumento corresponde a un mayor contenido en glucosa, fructosa y rafinosa (Palma y cols., 2014). La respuesta encontrada fue similar a la descrita por Cao y cols. (2013) en frutos de variedades de níspero con distinto grado de tolerancia al frío durante su conservación refrigerada. El preacondicionamiento, en cambio, no aumentó el contenido de los mismos respecto a los frutos control. Se han descrito resultados similares aplicando algunos tratamientos postcosecha. Por ejemplo, el tratamiento de fresas con CO<sub>2</sub> (Bodelón y cols., 2010) disminuye el contenido inicial tanto de azúcares reductores como de sacarosa. La disminución de los azúcares solubles con los



## *Discusión*

---

diferentes tratamientos puede estar relacionada con el consumo de los mismos por ejemplo en la glucólisis.

## **6.CONCLUSIONES**







1. La conservación en frío del fruto de calabacín reduce la pérdida de agua, que ocurre en frutos a temperatura ambiente, aunque induce el desarrollo de daños por frío. Estos daños consisten en alteraciones histológicas que afectan principalmente al exocarpo del fruto. La peroxidación lipídica (MDA) y la pérdida de electrolitos, indicadores de daños a nivel de membrana, son buenos indicativos de los daños por frío en los frutos de calabacín. También los parámetros indicadores de estrés oxidativo, como el contenido en  $H_2O_2$ , y la disminución de la actividad catalasa, son buenos indicadores de la pérdida de calidad en el fruto.
2. El análisis de la postcosecha de frutos de distintas variedades de calabacín cultivadas en la provincia de Almería mostró la existencia de diferencias genotípicas en la respuesta frente al frío. Aunque los frutos de todas las variedades estudiadas son susceptibles al frío, el desarrollo de daños fue menor en los frutos de la variedad Natura y mayor en la variedad Sinatra.
3. Los frutos de calabacín de la variedad Natura, más tolerantes al frío, presentan niveles menores de los parámetros indicativos de daños en las membranas, como son la pérdida de electrolitos, la peroxidación lipídica y las enzimas del catabolismo de lípidos, junto con contenidos menores de  $H_2O_2$ , putrescina, GABA, ACC y ácido salicílico, indicando un menor grado de estrés. La mayor actividad de algunas enzimas como la catalasa, así como el aumento del contenido en glutatión, prolina y azúcares solubles pueden relacionarse con la mayor tolerancia al frío que presentan estos frutos.
4. De los tratamientos previos a la frigoconservación, los más efectivos en la reducción del desarrollo de daños por frío de los frutos fueron la aplicación exógena de la poliamina putrescina y el tratamiento de preacondicionamiento a temperatura moderada.
5. El tratamiento de preacondicionamiento induce tolerancia al frío en los frutos de calabacín incluso en las variedades más sensibles. Esta inducción de tolerancia se relaciona con el mantenimiento de la



## *Conclusiones*

---

integridad de las membranas, mediante la mejora del estatus energético y el incremento del contenido en ácidos grasos, el aumento la defensa antioxidante, especialmente mediante las enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa, y de los niveles de algunos metabolitos implicados en la resistencia frente a condiciones de estrés como el ascorbato y el aminoácido prolina.



## **7.REFERENCIAS**

---







- Agustí, M., Almela, V., Juan, M., Alférez, F., Tadeo, F. y Zacarías, L. (2001) Histological and physiological characterization of rind breakdown of 'Navelate' sweet orange. *Annals of Botany*, 88, 415-422.
- Airaki, M., Sánchez-Moreno, L., Leterrier, M., Barroso, J.B., Palma, J.M. y Corpas, F.J. (2011) Detection and quantification of S-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant and Cell Physiology*, 52, 2006-2015.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P. y Tiburcio, A.F. (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231, 1237-1249.
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J.C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A.F. y Altabella, T. (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology letters*, 28, 1867-1876.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. y Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24, 1337-1344.
- Alférez, F., Alquézar, B., Burns, J.K. y Zacarías, L. (2010) Variation in water, osmotic and turgor potential in peel of 'Marsh' grapefruit during development of postharvest peel pitting. *Postharvest Biology and Technology*, 56, 44-49.
- Alférez, F. y Burns, J.K. (2004) Postharvest peel pitting at non-chilling temperatures in grapefruit is promoted by changes from low to high relative humidity during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 79-87.
- Alférez, F. y Zacarías, L. (2013) Influence of fruit maturity in the susceptibility of Navelina oranges to develop postharvest non-chilling peel pitting. *Food Science and Technology International*, 1082013213476077.
- Alonso, A., Queiroz, C.S. y Magalhaes, A.C. (1997) Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1323, 75-84.
- Alós, E., Rodrigo, M.J. y Zacarías, L. (2013) Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 207, 2-11.
- Alquézar, B., Mesejo, C., Alférez, F., Agustí, M. y Zacarías, L. (2010) Morphological and ultrastructural changes in peel of 'Navelate' oranges in relation to variations in relative humidity during postharvest storage and development of peel pitting. *Postharvest Biology and Technology*, 56, 163-170.
- Alscher, R.G., Erturk, N. y Heath, L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1331-1341.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Arbona, V., Hossain, Z., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M. y Gómez-Cadenas, A. (2008) Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum*, 132, 452-466.



- Asada, K. y Badger, M.R.** (1984) Photoreduction of  $^{18}\text{O}_2$  and  $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$  with concomitant evolution of  $^{16}\text{O}_2$  in intact spinach chloroplasts: evidence for scavenging of hydrogen peroxide by peroxidase. *Plant and Cell Physiology*, 25, 1169-1179.
- Ashraf, M. y Foolad, M.** (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M. y Laakso, S.** (1981) Lipoxygenase from soybeans: EC 1.13.11.12 Linoleate:oxygen oxidoreductase. In: *Methods in Enzymology* John, M.L. Academic Press, pp. 441-451.
- Balandrán-Quintana, R.R., Mendoza-Wilson, A.M., Vargas-Arispuro, I. y Martínez-Téllez, M.Á.** (2007) Activity of  $\beta$ -galactosidase and polygalacturonase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.) stored at low temperatures. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 396-401.
- Bassal, M. y El-Hamahmy, M.** (2011) Hot water dip and preconditioning treatments to reduce chilling injury and maintain postharvest quality of Navel and Valencia oranges during cold quarantine. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 186-191.
- Bates, L., Waldren, R. y Teare, I.** (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Baysal, T. y Demirdöven, A.** (2007) Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 491-496.
- Beauchamp, C. y Fridovich, I.** (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Ben-Amor, M., Flores, B., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J.C. y Fomjaro, F.** (1999) Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase RNA prevents chilling injury in Charentais cantaloupe melons. *Plant, Cell & Environment*, 22, 1579-1586.
- Benzie, I.F.F. y Strain, J.J.** (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Beyer, W.F.J. y Fridovich, I.** (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161, 559-566.
- Bisognin, D.A.** (2002) Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural*, 32, 715-723.
- Blanca, J., Cañizares, J., Roig, C., Ziarsolo, P., Nuez, F. y Picó, B.** (2011) Transcriptome characterization and high throughput SSRs and SNPs discovery in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *BMC genomics*, 12, 104.
- Blanch, M., Álvarez, I., Sánchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I. y Merodio, C.** (2012a) Increasing catechin and procyanidin accumulation in high- $\text{CO}_2$ -treated *Fragaria vesca* strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7489-7496.
- Blanch, M., Rosales, R., Goya, L., Sánchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I. y Merodio, C.** (2013) NADP-malic enzyme and glutathione reductase contribute to glutathione regeneration in *Fragaria vesca* fruit treated with protective high  $\text{CO}_2$  concentrations. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 431-436.
-



- Blanch, M., Sánchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I. y Merodio, C.** (2011) Fructo-oligosaccharides in table grapes and response to storage. *Food Chemistry*, 129, 724-730.
- Blanch, M., Sánchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I. y Merodio, C.** (2012b) Water distribution and ionic balance in response to high CO<sub>2</sub> treatments in strawberries (*Fragaria vesca* L. cv. Mara de Bois). *Postharvest Biology and Technology*, 73, 63-71.
- Bleecker, A.B. y Kende, H.** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 16, 1-18.
- Bodelón, O.G., Blanch, M., Sánchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I. y Merodio, C.** (2010) The effects of high CO<sub>2</sub> levels on anthocyanin composition, antioxidant activity and soluble sugar content of strawberries stored at low non-freezing temperature. *Food Chemistry*, 122, 673-678.
- Bouché, N. y Fromm, H.** (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*, 9, 110-115.
- Bridges, S.M. y Salin, M.L.** (1981) Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiology*, 68, 275-278.
- Brovelli, E.A., Brecht, J.K., Sherman, W.B. y Sims, C.A.** (1998) Anatomical and physiological responses of melting-and nonmelting-flesh peaches to postharvest chilling. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123, 668-674.
- Brummell, D.A., Dal Cin, V., Lurie, S., Crisosto, C.H. y Labavitch, J.M.** (2004) Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2041-2052.
- Cai, C., Xu, C., Shan, L., Li, X., Zhou, C., Zhang, W., Ferguson, I. y Chen, K.** (2006) Low temperature conditioning reduces postharvest chilling injury in loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 252-259.
- Cai, Y., Cao, S., Yang, Z. y Zheng, Y.** (2011) MeJA regulates enzymes involved in ascorbic acid and glutathione metabolism and improves chilling tolerance in loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 324-326.
- Cajuste, J.F., García-Breijo, F.J., Reig-Armiñana, J. y Lafuente, M.T.** (2011) Ultrastructural and histochemical analysis reveals ethylene-induced responses underlying reduced peel collapse in detached citrus fruit. *Microscopy research and technique*, 74, 970-979.
- Campos, P.S., Quartin, V., Ramalho, J.C. y Nunes, M.A.** (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*, 160, 283-292.
- Candan, A.P., Graell, J. y Larrigaudière, C.** (2008) Roles of climacteric ethylene in the development of chilling injury in plums. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 107-112.
- Cao, S., Cai, Y., Yang, Z., Joyce, D.C. y Zheng, Y.** (2014) Effect of MeJA treatment on polyamine, energy status and anthracnose rot of loquat fruit. *Food Chemistry*, 145, 86-89.



- Cao, S., Cai, Y., Yang, Z. y Zheng, Y. (2012) MeJA induces chilling tolerance in loquat fruit by regulating proline and  $\gamma$ -aminobutyric acid contents. *Food Chemistry*, 133, 1466-1470.
- Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y. y Lu, B. (2010a) Synergistic effect of heat treatment and salicylic acid on alleviating internal browning in cold-stored peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 58, 93-97.
- Cao, S., Yang, Z., Cai, Y. y Zheng, Y. (2011) Fatty acid composition and antioxidant system in relation to susceptibility of loquat fruit to chilling injury. *Food Chemistry*, 127, 1777-1783.
- Cao, S., Yang, Z. y Zheng, Y. (2013) Sugar metabolism in relation to chilling tolerance of loquat fruit. *Food Chemistry*, 136, 139-143.
- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Jin, P. y Rui, H. (2009a) Methyl jasmonate reduces chilling injury and enhances antioxidant enzyme activity in postharvest loquat fruit. *Food Chemistry*, 115, 1458-1463.
- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H. y Tang, S. (2009b) Effects of 1-methylcyclopropene on oxidative damage, phospholipases and chilling injury in loquat fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2214-2220.
- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H. y Tang, S. (2010b) Effect of methyl jasmonate on cell wall modification of loquat fruit in relation to chilling injury after harvest. *Food Chemistry*, 118, 641-647.
- Carvajal, F., Martínez, C., Jamilena, M. y Garrido, D. (2011) Differential response of zucchini varieties to low storage temperature. *Scientia Horticulturae*, 130, 90-96.
- Cisneros-Zevallos, L. (2003) The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 68, 1560-1564.
- Civello, P.M., Martínez, G.A., Chaves, A.R. y Añón, M.C. (1997) Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4589-4594.
- Concellón, A., Añón, M.C. y Chaves, A.R. (2005) Effect of chilling on ethylene production in eggplant fruit. *Food Chemistry*, 92, 63-69.
- Corpas, F., Barroso, J., Sandalio, L., Distefano, S., Palma, J., Lupiáñez, J. y Del Río, L. (1998) A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochem. J*, 330, 777-784.
- Cosio, C. y Dunand, C. (2009) Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, 60, 391-408.
- Craig, W., Lenzi, P., Scotti, N., De Palma, M., Saggese, P., Carbone, V., Curran, N.M., Magee, A.M., Medgyesy, P. y Kavanagh, T.A. (2008) Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. *Transgenic research*, 17, 769-782.
- Creelman, R.A. y Mullet, J.E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 355-381.
- Cuevas, J.C., López-Cobollo, R., Alcázar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A.F. y Ferrando, A. (2008) Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiology*, 148, 1094-1105.
-



- Champa, W.A.H., Gill, M.I.S., Mahajan, B.V.C. y Arora, N.K.** (2014) Postharvest treatment of polyamines maintains quality and extends shelf-life of table grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Flame Seedless. *Postharvest Biology and Technology*, 91, 57-63.
- Chance, B. y Maehly, A.C.** (1955) Assay of catalases and peroxidases. In: *Methods in Enzymology* Academic Press, pp. 764-775.
- Chapman, K.D.** (1998) Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends in Plant Science*, 3, 419-426.
- Chaudhary, P.R., Jayaprakasha, G., Porat, R. y Patil, B.S.** (2014) Low temperature conditioning reduces chilling injury while maintaining quality and certain bioactive compounds of 'Star Ruby' grapefruit. *Food Chemistry*, 153, 243-249.
- Chelikani, P., Fita, I. y Loewen, P.C.** (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61, 192-208.
- Chen, B. y Yang, H.** (2013) 6-Benzylaminopurine alleviates chilling injury of postharvest cucumber fruit through modulating antioxidant system and energy status. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1915-1921.
- Chen, J.-y., He, L.-h., Jiang, Y.m., Wang, Y., Joyce, D.C., Ji, Z.-l. y Lu, W.-j.** (2008) Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. *Physiologia Plantarum*, 132, 318-328.
- Chen, M. y Thelen, J.J.** (2013) ACYL-LIPID DESATURASE2 is required for chilling and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 25, 1430-1444.
- Chen, T.H. y Murata, N.** (2008) Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science*, 13, 499-505.
- Chen, T.H. y Murata, N.** (2011) Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell & Environment*, 34, 1-20.
- Chen, W.P. y Li, P.H.** (2002) Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea mays* L.) cultured cells. *Plant, Cell & Environment*, 25, 955-962.
- Chidtragool, S., Ketsa, S., Bowen, J., Ferguson, I.B. y van Doorn, W.G.** (2011) Chilling injury in mango fruit peel: Cultivar differences are related to the activity of phenylalanine ammonia lyase. *Postharvest Biology and Technology*, 62, 59-63.
- Chisari, M., Silveira, A.C., Barbagallo, R.N., Spagna, G. y Artés, F.** (2009) Ripening stage influenced the expression of polyphenol oxidase, peroxidase, pectin methylesterase and polygalacturonase in two melon cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 940-946.
- Choi, S., Jeong, S., Jeong, W., Kwon, S., Chow, W. y Park, Y.-I.** (2002) Chloroplast Cu/Zn-superoxide dismutase is a highly sensitive site in cucumber leaves chilled in the light. *Planta*, 216, 315-324.
- Chongchatuporn, U., Ketsa, S. y van Doorn, W.G.** (2013) Chilling injury in mango (*Mangifera indica*) fruit peel: Relationship with ascorbic acid concentrations and antioxidant enzyme activities. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 409-417.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M. y Bolwell, G.P.** (2012) The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis*



- is a major component of pattern-triggered immunity. *The Plant Cell Online*, 24, 275-287.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M. y Barroso, J.B.** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141, 330-335.
- Deng, Y., Wu, Y. y Li, Y.** (2005) Changes in firmness, cell wall composition and cell wall hydrolases of grapes stored in high oxygen atmospheres. *Food Research International*, 38, 769-776.
- Ding, C.-K., Wang, C., Gross, K.C. y Smith, D.L.** (2002) Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*, 214, 895-901.
- Ding, C.-K., Wang, C.Y., Gross, K.C. y Smith, D.L.** (2001) Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science*, 161, 1153-1159.
- Dixon, R.A. y Paiva, N.L.** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7, 1085.
- Drolet, G., Dumbroff, E.B., Legge, R.L. y Thompson, J.E.** (1986) Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*, 25, 367-371.
- Duan, M., Feng, H.-L., Wang, L.-Y., Li, D. y Meng, Q.-W.** (2012) Overexpression of thylakoidal ascorbate peroxidase shows enhanced resistance to chilling stress in tomato. *Journal of Plant Physiology*, 169, 867-877.
- Duroux, L. y Welinder, K.G.** (2003) The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *Journal of molecular evolution*, 57, 397-407.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S. y Mullineaux, P.** (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180, 278-284.
- El Airaj, H., Gest, N., Truffault, V., Garchery, C., Riqueau, G., Gouble, B., Page, D. y Stevens, R.** (2013) Decreased monodehydroascorbate reductase activity reduces tolerance to cold storage in tomato and affects fruit antioxidant levels. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 502-510.
- Esaka, M., Yamada, N., Kitabayashi, M., Setoguchi, Y., Tsugeki, R., Kondo, M. y Nishimura, M.** (1997) cDNA cloning and differential gene expression of three catalases in pumpkin. *Plant Molecular Biology*, 33, 141-155.
- Escribano, M.L., Del Cura, B., Muñoz, T. y Merodio, C.** (1997) The effect of high carbon dioxide at low temperature on ribulose 1,5-biphosphate carboxylase and polygalacturonase protein levels in cherimoya fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122, 258-262.
- Esteras, C., Nuez, F. y Picó, B.** (2011) Genetic diversity studies in Cucurbits using molecular tools. In: *Genetics, Genomics and Breeding of Cucurbits*. Yi-Hong, W., Behera, T.K., Kole, C. (Eds.) Science Publishers Inc, Enfield, New Hampshire, pp. 140-198.
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G. y Fernie, A.R.** (2008) Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science*, 13, 14-19.
-





- Ferguson, I., Volz, R. y Woolf, A. (1999) Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 255-262.
- Fernández-Caballero, C., Rosales, R., Romero, I., Escribano, M.I., Merodio, C. y Sánchez-Ballesta, M.T. (2012) Unraveling the roles of *CBF1*, *CBF4* and dehydrin 1 genes in the response of table grapes to high CO<sub>2</sub> levels and low temperature. *Journal of Plant Physiology*, 169, 744-748.
- Ferriol, M., Picó, B. y Nuez, F. (2003) Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 271-282.
- Feussner, I. y Wasternack, C. (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 275-297.
- Figueroa-Yáñez, L., Cano-Sosa, J., Castaño, E., Arroyo-Herrera, A.-L., Caamal-Velazquez, J.H., Sanchez-Teyer, F., López-Gómez, R., De Los Santos-Briones, C. y Rodríguez-Zapata, L. (2012) Phylogenetic relationships and expression in response to low temperature of a catalase gene in banana (*Musa acuminata* cv. "Grand Nain") fruit. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109, 429-438.
- Flores, H.E. y Galston, A.W. (1982) Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiology*, 69, 701-706.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F. y Scott, I.M. (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100, 241-254.
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell Online*, 17, 1866-1875.
- Frentzen, M., Heinz, E., McKeon, T.A. y Stumpf, P.K. (1983) Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, 129, 629-636.
- Fung, R.W., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tao, Y. y Tian, M. (2006) Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *Journal of Plant Physiology*, 163, 1049-1060.
- Fung, R.W., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C. y Tian, M. (2004) MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 166, 711-719.
- Galston, A.W. y Kaur-Sawhney, R. (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology*, 94, 406-410.
- Girardi, C.L., Corrent, A.R., Lucchetta, L., Zanuzo, M.R., Costa, T.S.d., Brackmann, A., Twyman, R.M., Nora, F.R., Nora, L., Silva, J.A. y Rombaldi, C.V. (2005) Effect of ethylene, intermittent warming and controlled atmosphere on postharvest quality and the occurrence of woolliness in peach (*Prunus persica* cv. Chiripá) during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 38, 25-33.



- Goñi, Ó., Sánchez-Ballesta, M.T., Merodio, C. y Escribano, M.I.** (2009) Regulation of defense and cryoprotective proteins by high levels of CO<sub>2</sub> in *Annona* fruit stored at chilling temperature. *Journal of Plant Physiology*, 166, 246-258.
- Goñi, Ó., Sánchez-Ballesta, M.T., Merodio, C. y Escribano, M.I.** (2010) Potent cryoprotective activity of cold and CO<sub>2</sub>-regulated cherimoya (*Annona cherimola*) endochitinase. *Journal of Plant Physiology*, 167, 1119-1129.
- Goñi, Ó., Sánchez-Ballesta, M.T., Merodio, C. y Escribano, M.I.** (2011) A cryoprotective and cold-adapted 1, 3-β-endoglucanase from cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. *Phytochemistry*, 72, 844-854.
- Goto, M., Minamide, T., Fujii, M. y Iwata, T.** (1984) Preventive effect of cold-shock on chilling injury of mume (Japanese apricot, *Prunus mume* Sieb. et. Zucc.) fruits in relation to changes of permeability and fatty acid composition of membrane. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 53, 210-218.
- Gupta, M.N. y Wold, F.** (1980) A convenient spectrophotometric assay for phospholipase D using *p*-nitrophenyl-phosphocholine as substrate. *Lipids*, 15, 594-596.
- Hakim, A., Purvis, A.C. y Mullinix, B.G.** (1999) Differences in chilling sensitivity of cucumber varieties depends on storage temperature and the physiological dysfunction evaluated. *Postharvest Biology and Technology*, 17, 97-104.
- Halliwell, B. y Foyer, C.H.** (1976) Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochem. J.*, 155, 697-700.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580.
- Hare, P. y Cress, W.** (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21, 79-102.
- Hariyadi, P. y Parkin, K.L.** (1991) Chilling-induced oxidative stress in cucumber fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 1, 33-45.
- Havelda, Z. y Maule, A.J.** (2000) Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *The Plant Cell Online*, 12, 1975-1985.
- He, L.-h., Chen, J.-y., Kuang, J.-f. y Lu, W.-j.** (2012) Expression of three sHSP genes involved in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1924-1930.
- He, Q., Hong, K., Zou, R., Liao, F., Cui, S., Zhang, E. y Huang, M.** (2014) The role of jasmonic acid and lipoxygenase in propylene-induced chilling tolerance on banana fruit. *European Food Research and Technology*, 238, 71-78.
- Heath, R.L. y Packer, L.** (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
- Heby, O. y Persson, L.** (1990) Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 15, 153-158.
- Hernández, M., Fernández-García, N., Díaz-Vivancos, P. y Olmos, E.** (2010) A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. *Journal of Experimental Botany*, 61, 521-535.
-



- Hirayama, T., Ohto, C., Mizoguchi, T. y Shinozaki, K.** (1995) A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 3903-3907.
- Hossain, M.A. y Asada, K.** (1984) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant and Cell Physiology*, 25, 1285-1295.
- Hossain, M.A., Nakano, Y. y Asada, K.** (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology*, 25, 385-395.
- Hu, W., Song, X., Shi, K., Xia, X., Zhou, Y. y Yu, J.** (2008) Changes in electron transport, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes in chloroplasts and mitochondria of cucumber leaves as influenced by chilling. *Photosynthetica*, 46, 581-588.
- Huang, R.-H., Liu, J.-H., Lu, Y.-M. y Xia, R.-X.** (2008) Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of 'Cara cara' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) at different storage temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 168-175.
- Inaba, M. y Philip, G.** (1986) Cold-shock treatment of mature green tomatoes to delay color development and increase shelf-life during room temperature storage. In: *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, pp. 143-145.
- Irigoyen, J.J., Einerich, D.W. y Sánchez-Díaz, M.** (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84, 55-60.
- Ishizaki-Nishizawa, O., Fujii, T., Azuma, M., Sekiguchi, K., Murata, N., Ohtani, T. y Toguri, T.** (1996) Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nature Biotechnology*, 14, 1003-1006.
- Jahnke, L.S., Hull, M.R. y Long, S.P.** (1991) Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant, Cell & Environment*, 14, 97-104.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I. y Paldi, E.** (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, 208, 175-180.
- Jeffrey, C.** (1990) Systematics of the *Cucurbitaceae*: an overview. In: *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Bates, D.M., Robinson, R.W., Jeffrey, C. (Eds.) Comstock Publication Associates, Cornell University Press, Ithaca, New York, pp. 3-9.
- Jeffrey, C.** (2005) A new system of *Cucurbitaceae*. *Botanicheskii Zhurnal*, 90, 332-335.
- Jing-Hua, Y., Yuan, G., Yan-Man, L., Xiao-Hua, Q. y Zhang, M.-F.** (2008) Salicylic acid-induced enhancement of cold tolerance through activation of antioxidative capacity in watermelon. *Scientia Horticulturae*, 118, 200-205.
- Kader, A.** (2002) Fruits in the global market. In: *Fruit quality and its biological basis*. Columbus: Sheffield Academic, pp. 1-14.



- Kader, A.A., Zagory, D., Kerbel, E.L. y Wang, C.Y.** (1989) Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 28, 1-30.
- Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D.Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R. y Guy, C.L.** (2007) Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant Journal*, 50, 967-981.
- Karabudak, T., Bor, M., Özdemir, F. y Türkan, İ.** (2014) Glycine betaine protects tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at low temperature by inducing fatty acid desaturase7 and lipoxygenase gene expression. *Molecular Biology Reports*, 41, 1401-1410.
- Karpinski, S., Wingsle, G., Karpinska, B. y Hallgren, J.** (2002) Low-temperature stress and antioxidant defense mechanisms in higher plants. In: *Oxidative stress in plants* Inze, D. y Van Montagu, M. London and New York Taylor & Francis, pp. 69-104.
- Keren-Keiserman, A., Tanami, Z., Shoseyov, O. y Ginzberg, I.** (2004) Peroxidase activity associated with suberization processes of the muskmelon (*Cucumis melo*) rind. *Physiologia Plantarum*, 121, 141-148.
- Kishor, P.K., Sangam, S., Amrutha, R., Laxmi, P.S., Naidu, K., Rao, K., Rao, S., Reddy, K., Theriappan, P. y Sreenivasulu, N.** (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88, 424-438.
- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M. y Iba, K.** (1994) Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast  $\omega$ -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiology*, 105, 601-605.
- Koushesh saba, M., Arzani, K. y Barzegar, M.** (2012) Postharvest polyamine application alleviates chilling injury and affects apricot storage ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8947-8953.
- Kramer, G. y Wang, C.** (1990) Effects of chilling and temperature preconditioning on the activity of polyamine biosynthetic enzymes in zucchini squash. *Journal of Plant Physiology*, 136, 115-119.
- Kramer, G.F. y Wang, C.Y.** (1989) Correlation of reduced chilling injury with increased spermine and spermidine levels in zucchini squash. *Physiologia Plantarum*, 76, 479-484.
- Kuk, Y.I., Lee, J.H., Kim, H.Y., Chung, S.J., Chung, G.C., Guh, J.O., Lee, H.J. y Burgos, N.R.** (2003) Relationships of cold acclimation and antioxidative enzymes with chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 661-666.
- Kunst, L. y Samuels, L.** (2009) Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 721-727.
- Kurioka, S. y Matsuda, M.** (1976) Phospholipase C assay using *p*-nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. *Analytical Biochemistry*, 75, 281-289.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C. y Takahashi, Y.** (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228, 367-381.
-



- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lafuente, M., Martínez-Téllez, M. y Zacarías, L.** (1997) Abscisic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, 494-502.
- Lafuente, M.a.T., Zacarías, L., Martínez-Téllez, M.Á., Sánchez-Ballesta, M.a.T. y Granell, A.** (2003) Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 309-318.
- Lafuente, M.T., Belver, A., Guye, M.G. y Saltveit, M.E.** (1991) Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons: possible role of abscisic acid and heat shock proteins. *Plant Physiology*, 95, 443-449.
- Lafuente, M.T., Sala, J.M. y Zacarías, L.** (2004) Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3606-3611.
- Lafuente, M.T., Zacarías, L., Martínez-Téllez, M.A., Sánchez-Ballesta, M.T. y Dupille, E.** (2001) Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 6020-6025.
- Lara, I., Belge, B. y Goulao, L.F.** (2014) The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality. *Postharvest Biology and Technology*, 87, 103-112.
- Larrigaudière, C., Candan, A.P., Ubach, D. y Graell, J.** (2009) Physiological response of 'Larry Ann' plums to cold storage and 1-MCP treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 56-61.
- Lee, D.H. y Lee, C.B.** (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science*, 159, 75-85.
- Leterrier, M., Barroso, J.B., Valderrama, R., Palma, J.M. y Corpas, F.J.** (2012) NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis* roots contributes in the mechanism of defence against the nitro-oxidative stress induced by salinity. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Li, F., Wu, Q.-Y., Sun, Y.-L., Wang, L.-Y., Yang, X.-H. y Meng, Q.-W.** (2010) Overexpression of chloroplastic monodehydroascorbate reductase enhanced tolerance to temperature and methyl viologen-mediated oxidative stresses. *Physiologia Plantarum*, 139, 421-434.
- Li, P., Zheng, X., Liu, Y. y Zhu, Y.** (2014) Pre-storage application of oxalic acid alleviates chilling injury in mango fruit by modulating proline metabolism and energy status under chilling stress. *Food Chemistry*, 142, 72-78.
- Lim, C.S., Kang, S.M., Cho, J.L. y Gross, K.C.** (2009) Antioxidizing enzyme activities in chilling-sensitive and chilling-tolerant pepper fruit as affected by stage of ripeness and storage temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134, 156-163.
- Linster, C.L. y Clarke, S.G.** (2008) L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. *Trends in Plant Science*, 13, 567-573.



- Liu, J., Nada, K., Pang, X., Honda, C., Kitashiba, H. y Moriguchi, T.** (2006) Role of polyamines in peach fruit development and storage. *Tree Physiology*, 26, 791-798.
- Liu, Q., Zhang, C., Yang, Y. y Hu, X.** (2010) Genome-wide and molecular evolution analyses of the phospholipase D gene family in poplar and grape. *BMC plant biology*, 10, 117.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Luengwilai, K., Saltveit, M. y Beckles, D.M.** (2012) Metabolite content of harvested Micro-Tom tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit is altered by chilling and protective heat-shock treatments as shown by GC-MS metabolic profiling. *Postharvest Biology and Technology*, 63, 116-122.
- Lurie, S.** (1998) Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14, 257-269.
- Luza, J., Van Gorsel, R., Polito, V. y Kader, A.** (1992) Chilling injury in peaches: a cytochemical and ultrastructural cell wall study. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117, 114-118.
- Lyons, J.M.** (1973) Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 24, 455-466.
- Lyons, J.M. y Raison, J.K.** (1970) Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiology*, 45, 386-389.
- MacRae, E.A. y Ferguson, I.B.** (1985) Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. *Physiologia Plantarum*, 65, 51-56.
- Mahajan, S. y Tuteja, N.** (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139-158.
- Maldonado, R., Molina-García, A.D., Sánchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I. y Merodio, C.** (2002) High CO<sub>2</sub> atmosphere modulating the phenolic response associated with cell adhesion and hardening of *Annona cherimola* fruit stored at chilling temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7564-7569.
- Maldonado, R., Sánchez-Ballesta, M.T., Alique, R., Escribano, M.I. y Merodio, C.** (2004) Malate metabolism and adaptation to chilling temperature storage by pretreatment with high CO<sub>2</sub> levels in *Annona cherimola* fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4758-4763.
- Manganaris, G.A., Vasilakakis, M., Diamantidis, G. y Mignani, I.** (2006) Cell wall physicochemical aspects of peach fruit related to internal breakdown symptoms. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 69-74.
- Mao, L.-C., Wang, G.-Z., Zhu, C.-G. y Pang, H.-Q.** (2007a) Involvement of phospholipase D and lipoxygenase in response to chilling stress in postharvest cucumber fruits. *Plant Science*, 172, 400-405.
-



- Mao, L., Karakurt, Y. y Huber, D.J.** (2004) Incidence of water-soaking and phospholipid catabolism in ripe watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit: induction by ethylene and prophylactic effects of 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*, 33, 1-9.
- Mao, L., Pang, H., Wang, G. y Zhu, C.** (2007b) Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 42-47.
- Mao, L.C., Wang, G.Z., Zhu, C.G. y Pang, H.Q.** (2007c) Involvement of phospholipase D and lipoxygenase in response to chilling stress in postharvest cucumber fruits. *Plant Science*, 172, 400-405.
- Marangoni, A.G., Jackman, R.L. y Stanley, D.W.** (1995) Chilling-associated softening of tomato fruit is related to increased pectinmethylesterase activity. *Journal of Food Science*, 60, 1277-1281.
- Marangoni, A.G., Palma, T. y Stanley, D.W.** (1996) Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biology and Technology*, 7, 193-217.
- Martínez-Téllez, M., Ramos-Clamont, M., Gardea, A. y Vargas-Arispuro, I.** (2002) Effect of infiltrated polyamines on polygalacturonase activity and chilling injury responses in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295, 98-101.
- Maul, P., McCollum, G., Guy, C.L. y Porat, R.** (2011) Temperature conditioning alters transcript abundance of genes related to chilling stress in 'Marsh' grapefruit flavedo. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 177-185.
- Maul, P., McCollum, G.T., Popp, M., Guy, C.L. y Porat, R.** (2008) Transcriptome profiling of grapefruit flavedo following exposure to low temperature and conditioning treatments uncovers principal molecular components involved in chilling tolerance and susceptibility. *Plant, Cell & Environment*, 31, 752-768.
- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M. y Inzé, D.** (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 49, 649-667.
- McDonald, R.E. y Kushad, M.M.** (1986) Accumulation of putrescine during chilling injury of fruits. *Plant Physiology*, 82, 324-326.
- McGee, J.D., Roe, J.L., Sweat, T.A., Wang, X., Guikema, J.A. y Leach, J.E.** (2003) Rice phospholipase D isoforms show differential cellular location and gene induction. *Plant and Cell Physiology*, 44, 1013-1026.
- Medeira, M., Maia, M. y Vitor, R.** (1999) The first stages of pre-harvest 'peel pitting' development in 'Encore' mandarin. An histological and ultrastructural study. *Annals of Botany*, 83, 667-673.
- Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., Barrera, A., Rosales, R., Valenzuela, J.L., Garrido, D. y Jamilena, M.** (2014) Cold-induced ethylene in relation to chilling injury and chilling sensitivity in the non-climacteric fruit of zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 57, 194-199.
- Meijer, H.J.G. y Munnik, T.** (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 265-306.
- Mencarelli, F., Lipton, W. y Peterson, S.** (1983) Responses of zucchini squash to storage in low-O<sub>2</sub> atmospheres at chilling and nonchilling temperatures. *Journal American Society for Horticultural Science*, 108.



- Merodio, C., Muñoz, M.T., Del Cura, B. y Buitrago, D.** (1998) Effect of high CO<sub>2</sub> level on the titres of  $\gamma$ -aminobutyric acid, total polyamines and some pathogenesis-related proteins in cherimoya fruit stored at low temperature. *Journal of Experimental Botany*, 49, 1339-1347.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. y Noctor, G.** (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61, 4197-4220.
- Mittler, R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405-410.
- Mittler, R. y Zilinskas, B.A.** (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 212, 540-546.
- Murata, N. y Los, D.A.** (1997) Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiology*, 115, 875.
- Murata, N., Sato, N., Takahashi, N. y Hamazaki, Y.** (1982) Compositions and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant and Cell Physiology*, 23, 1071-1079.
- Murata, N. y Tasaka, Y.** (1997) Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1348, 10-16.
- Nair, S. y Singh, Z.** (2003) Pre-storage ethrel dip reduces chilling injury, enhances respiration rate, ethylene production and improves fruit quality of 'Kensington' mango. *Food Agric. Environ*, 1, 93-97.
- Nemchenko, A., Kunze, S., Feussner, I. y Kolomiets, M.** (2006) Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3767-3779.
- Nguyen, T.B.T., Ketsa, S. y van Doorn, W.G.** (2003) Relationship between browning and the activities of polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 30, 187-193.
- Nishida, I. y Murata, N.** (1996) Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 541-568.
- Noctor, G. y Foyer, C.H.** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
- Novo-Uzal, E., Fernández-Pérez, F., Herrero, J., Gutiérrez, J., Gómez-Ros, L.V., Bernal, M.Á., Díaz, J., Cuello, J., Pomar, F. y Pedreño, M.Á.** (2013) From *Zinnia* to *Arabidopsis*: approaching the involvement of peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*, 64, 3499-3518.
- O'Kane, D., Gill, V., Boyd, P. y Burdon, R.** (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta*, 198, 371-377.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Finch, P., Butt, V.S., Whitelegge, J.P., Souda, P., Ausubel, F.M. y Bolwell, G.P.** (2012) A peroxidase-dependent apoplastic
-





- oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiology*, 158, 2013-2027.
- Obrero, A.n., Die, J.V., Román, B.n., Gómez, P., Nadal, S. y González-Verdejo, C.I.** (2011) Selection of reference genes for gene expression studies in zucchini (*Cucurbita pepo*) using qPCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5402-5411.
- Okuda, T., Matsuda, Y., Yamanaka, A. y Sagisaka, S.** (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiology*, 97, 1265-1267.
- Orlova, I.V., Serebriiskaya, T.S., Popov, V., Merkulova, N., Nosov, A.M., Trunova, T.I., Tsydendambaev, V.D. y Los, D.A.** (2003) Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants. *Plant and Cell Physiology*, 44, 447-450.
- Ortega-García, F. y Peragón, J.** (2010) Phenol metabolism in the leaves of the olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12440-12448.
- Paliyath, G. y Droillard, M.** (1992) The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiology and Biochemistry*, 30, 789-812.
- Palma, F., Carvajal, F., Lluch, C., Jamilena, M. y Garrido, D.** (2014) Changes in carbohydrate content in zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) under low temperature stress. *Plant Science*, 217, 78-86.
- Pappan, K., Austin-Brown, S., Chapman, K.D. y Wang, X.** (1998) Substrate specificities and lipid modulation of plant phospholipase D  $\alpha$ ,  $-\beta$ , and  $-\gamma$ . *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 353, 131-140.
- Paris, H.S.** (1996) Summer squash: history, diversity, and distribution. *HortTechnology*, 6, 6-13.
- Paris, H.S., Lebeda, A., Křístková, E., Andres, T.C. y Nee, M.H.** (2012) Parallel evolution under domestication and phenotypic differentiation of the cultivated subspecies of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Economic Botany*, 66, 71-90.
- Paris, H.S., Yonash, N., Portnoy, V., Mozes-Daube, N., Tzuri, G. y Katzir, N.** (2003) Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*) using DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 971-978.
- Pelloux, J., Rustérucci, C. y Mellerowicz, E.J.** (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, 12, 267-277.
- Pesis, E., Ackerman, M., Ben-Arie, R., Feygenberg, O., Feng, X., Apelbaum, A., Goren, R. y Prusky, D.** (2002) Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 171-181.
- Polenta, G.A., Calvete, J.J. y González, C.B.** (2007) Isolation and characterization of the main small heat shock proteins induced in tomato pericarp by thermal treatment. *FEBS Journal*, 274, 6447-6455.
- Pradet, A. y Raymond, P.** (1983) Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 34, 199-224.
- Qian, C., He, Z., Zhao, Y., Mi, H., Chen, X. y Mao, L.** (2013) Maturity-dependent chilling tolerance regulated by the antioxidative capacity in postharvest



- cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 626-633.
- Qin, C. y Wang, X.** (2002) The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD $\zeta$ 1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiology*, 128, 1057-1068.
- Qiu, X. y Erickson, L.** (1996) A pollen-specific polygalacturonase-like cDNA from alfalfa. *Sexual Plant Reproduction*, 9, 123-124.
- Queiroz, C., Alonso, A., Mares-Guia, M. y Magalhaes, A.** (1998) Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biologia Plantarum*, 41, 403-413.
- Raimbault, A.-K., Marie-Alphonsine, P.-A., Horry, J.-P., Francois-Haugrin, M., Romuald, K. y Soler, A.** (2010) Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after a chilling injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 342-348.
- Rajashekar, C.B., Zhou, H.-E., Zhang, Y., Li, W. y Wang, X.** (2006) Suppression of phospholipase D $\alpha$ 1 induces freezing tolerance in *Arabidopsis*: Response of cold-responsive genes and osmolyte accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 163, 916-926.
- Reynolds, E.S.** (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*, 17, 208-212.
- Rice-Evans, C., Miller, N. y Paganga, G.** (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Romero, I., Fernández-Caballero, C., Goñi, Ó., Escribano, M.I., Merodio, C. y Sánchez-Ballesta, M.T.** (2008a) Functionality of a class I beta-1,3-glucanase from skin of table grapes berries. *Plant Science*, 174, 641-648.
- Romero, I., Sánchez-Ballesta, M.T., Escribano, M.I. y Merodio, C.** (2008b) Individual anthocyanins and their contribution to total antioxidant capacity in response to low temperature and high CO<sub>2</sub> in stored Cardinal table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 1-9.
- Rosales, R., Fernández-Caballero, C., Romero, I., Escribano, M.I., Merodio, C. y Sánchez-Ballesta, M.T.** (2013) Molecular analysis of the improvement in rachis quality by high CO<sub>2</sub> levels in table grapes stored at low temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 77, 50-58.
- Rozenzweig, D., Elmaci, C., Samach, A., Lurie, S. y Porat, R.** (2004) Isolation of four heat shock protein cDNAs from grapefruit peel tissue and characterization of their expression in response to heat and chilling temperature stresses. *Physiologia Plantarum*, 121, 421-428.
- Ruelland, E., Cantrel, C., Gawer, M., Kader, J.-C. y Zachowski, A.** (2002) Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiology*, 130, 999-1007.
- Rugkong, A., McQuinn, R., Giovannoni, J.J., Rose, J.K.C. y Watkins, C.B.** (2011) Expression of ripening-related genes in cold-stored tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 61, 1-14.
- Rui, H., Cao, S., Shang, H., Jin, P., Wang, K. y Zheng, Y.** (2010) Effects of heat treatment on internal browning and membrane fatty acid in loquat fruit in



- response to chilling stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1557-1561.
- Sabehat, A., Lurie, S. y Weiss, D.** (1998) Expression of small heat-shock proteins at low temperatures: a possible role in protecting against chilling injuries. *Plant Physiology*, 117, 651-658.
- Sabehat, A., Weiss, D. y Lurie, S.** (1996) The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. *Plant Physiology*, 110, 531-537.
- Saibo, N.J., Lourenço, T. y Oliveira, M.M.** (2009) Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, 103, 609-623.
- Sala, J.M.** (1998) Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 13, 255-261.
- Sala, J.M. y Lafuente, M.a.T.** (2000) Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 81-89.
- Sala, J.M. y Lafuente, M.T.** (1999) Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid fortune mandarin fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2410-2414.
- Sánchez-Ballesta, M., Zacarías, L., Granell, A. y Lafuente, M.** (2000a) Accumulation of PAL transcript and PAL activity as affected by heat-conditioning and low-temperature storage and its relation to chilling sensitivity in mandarin fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2726-2731.
- Sánchez-Ballesta, M.T., Lafuente, M.T., Zacarías, L. y Granell, A.** (2000b) Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of Fortune mandarin fruits to cold temperature. *Physiologia Plantarum*, 108, 382-389.
- Sánchez-Ballesta, M.T., Romero, I., Jiménez, J.B., Orea, J.M., González-Ureña, Á., Escribano, M.I. y Merodio, C.** (2007) Involvement of the phenylpropanoid pathway in the response of table grapes to low temperature and high CO<sub>2</sub> levels. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 29-35.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B. y Cano, M.P.** (2003) Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 430-439.
- Sapitnitskaya, M., Maul, P., McCollum, G.T., Guy, C.L., Weiss, B., Samach, A. y Porat, R.** (2006) Postharvest heat and conditioning treatments activate different molecular responses and reduce chilling injuries in grapefruit. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2943-2953.
- Sato, Y., Masuta, Y., Saito, K., Murayama, S. y Ozawa, K.** (2011) Enhanced chilling tolerance at the booting stage in rice by transgenic overexpression of the ascorbate peroxidase gene, *OsAPXa*. *Plant Cell Reports*, 30, 399-406.
- Sato, Y., Murakami, T., Funatsuki, H., Matsuba, S., Saruyama, H. y Tanida, M.** (2001) Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 52, 145-151.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. y**



- Shinozaki, K.** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal*, 31, 279-292.
- Selcuk, N. y Erkan, M.** (2014) Changes in antioxidant activity and postharvest quality of sweet pomegranates cv. Hicrannar under modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 92, 29-36.
- Seppänen, M.M. y Fagerstedt, K.** (2000) The role of superoxide dismutase activity in response to cold acclimation in potato. *Physiologia Plantarum*, 108, 279-285.
- Serrano, M., Martínez-Madrid, M.C., Pretel, M.T., Riquelme, F. y Romojaro, F.** (1997) Modified atmosphere packaging minimizes increases in putrescine and abscisic acid levels caused by chilling injury in pepper fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1668-1672.
- Serrano, M., Pretel, M.T., Martínez-Madrid, M.C., Romojaro, F. y Riquelme, F.** (1998) CO<sub>2</sub> treatment of zucchini squash reduces chilling-induced physiological changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2465-2468.
- Sevillano, L., Sánchez-Ballesta, M.T., Romojaro, F. y Flores, F.B.** (2009) Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 555-573.
- Sevillano, L., Sola, M.M. y Vargas, A.M.** (2010) Induction of small heat-shock proteins in mesocarp of cherimoya fruit (*Annona cherimola* Mill.) produces chilling tolerance. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 625-638.
- Shang, H., Cao, S., Yang, Z., Cai, Y. y Zheng, Y.** (2011) Effect of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1264-1268.
- Shang, Q.-M., Li, L. y Dong, C.-J.** (2012) Multiple tandem duplication of the phenylalanine ammonia-lyase genes in *Cucumis sativus* L. *Planta*, 236, 1093-1105.
- Shelp, B.J., Bozzo, G.G., Trobacher, C.P., Zarei, A., Deyman, K.L. y Brikis, C.J.** (2012) Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science*, 193, 130-135.
- Shen, J., Tieman, D., Jones, J.B., Taylor, M.G., Schmelz, E., Huffaker, A., Bies, D., Chen, K. y Klee, H.J.** (2014) A 13-lipoxygenase, *TomloxC*, is essential for synthesis of C5 flavour volatiles in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 65, 419-428.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. y Yoshimura, K.** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1305-1319.
- Shigeoka, S., Nakano, Y. y Kitaoka, S.** (1980) Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* Z. by L-ascorbic acid peroxidase. *Biochemical Journal*, 186, 377.
- Shim, I.-S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D.-W. y Usui, K.** (2003) Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 39, 285-292.



- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Seki, M.** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 410-417.
- Singh, A., Pandey, A., Baranwal, V., Kapoor, S. y Pandey, G.K.** (2012) Comprehensive expression analysis of rice phospholipase D gene family during abiotic stresses and development. *Plant Signal. Behav*, 7, 847-855.
- Singh, S.P. y Singh, Z.** (2013) Controlled and modified atmospheres influence chilling injury, fruit quality and antioxidative system of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). *International Journal of Food Science & Technology*, 48, 363-374.
- Smirnoff, N.** (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, 78, 661-669.
- Smirnoff, N.** (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 229-235.
- Smith, B.D.** (2006) Eastern North America as an independent center of plant domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 12223-12228.
- Stevens, R., Page, D., Gouble, B., Garchery, C., Zamir, D. y Causse, M.** (2008) Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, Cell & Environment*, 31, 1086-1096.
- Su, G., An, Z., Zhang, W. y Liu, Y.** (2005) Light promotes the synthesis of lignin through the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated by diamine oxidases in soybean hypocotyls. *Journal of Plant Physiology*, 162, 1297-1303.
- Sui, N., Li, M., Zhao, S.-J., Li, F., Liang, H. y Meng, Q.-W.** (2007) Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene improves chilling tolerance in tomato. *Planta*, 226, 1097-1108.
- Sun, J.-h., Chen, J.-y., Kuang, J.-f., Chen, W.-x. y Lu, W.-j.** (2010) Expression of *sHSP* genes as affected by heat shock and cold acclimation in relation to chilling tolerance in plum fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 55, 91-96.
- Szabados, L. y Savouré, A.** (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15, 89-97.
- Szalai, G., Janda, T., Bartok, T. y Páldi, E.** (1997) Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize (*Zea mays*). *Physiologia Plantarum*, 101, 434-438.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B. y Popova, L.P.** (2006) Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, 67, 710-715.
- Thomashow, M.F.** (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 50, 571-599.
- Tóth, S.Z., Schansker, G. y Garab, G.** (2013) The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. *Physiologia Plantarum*, 148, 161-175.
- Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M.V., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Fernández-Ocaña, A.N.A., del Río, L.A. y Barroso, J.B.** (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant



- system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell & Environment*, 29, 1449-1459.
- Valero-Garrido, D., López-Frías, M., Llopis, J. y López-Jurado, M.** (1990) Influence of dietary fat on the lipid composition of perirenal adipose tissue in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 34, 327-332.
- Van Dijk, C., Boeriu, C., Stolle-Smits, T. y Tijskens, L.** (2006) The firmness of stored tomatoes (cv. Tradiro). 2. Kinetic and near infrared models to describe pectin degrading enzymes and firmness loss. *Journal of food engineering*, 77, 585-593.
- Vanlerberghe, G.C.** (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International journal of molecular sciences*, 14, 6805-6847.
- Veltman, R.H., Lenthéric, I., Van der Plas, L.H.W. y Peppelenbos, H.W.** (2003) Internal browning in pear fruit (*Pyrus communis* L. cv Conference) may be a result of a limited availability of energy and antioxidants. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 295-302.
- Vercher, R., Tadeo, F.R., Almela, V., Zaragoza, S., Primo-Millo, E. y Agustí, M.** (1994) Rind structure, epicuticular wax morphology and water permeability of 'Fortune' mandarin fruits affected by peel pitting. *Annals of Botany*, 74, 619-625.
- Vergnolle, C., Vaultier, M.-N., Taconnat, L., Renou, J.-P., Kader, J.-C., Zachowski, A. y Ruelland, E.** (2005) The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiology*, 139, 1217-1233.
- Verwoerd, T.C., Dekker, B.M.M. y Hoekema, A.** (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research*, 17, 2362.
- Vicente, A.R., Costa, M.L., Martínez, G.A., Chaves, A.R. y Civello, P.M.** (2005) Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 38, 213-222.
- Vicente, A.R., Manganaris, G.A., Minas, I.S., Goulas, V. y Lafuente, M.T.** (2013) Cell wall modifications and ethylene-induced tolerance to non-chilling peel pitting in citrus fruit. *Plant Science*, 210, 46-52.
- Vicente, A.R., Martínez, G.A., Chaves, A.R. y Civello, P.M.** (2006) Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 40, 116-122.
- Vogt, J., Schiller, D., Ulrich, D., Schwab, W. y Dunemann, F.** (2013) Identification of lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in fruit flavour formation in apple (*Malus × domestica*). *Tree Genetics & Genomes*, 9, 1493-1511.
- Wang, C.Y.** (1994) Combined treatment of heat shock and low temperature conditioning reduces chilling injury in zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology*, 4, 65-73.
- Wang, C.Y.** (1995a) Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology*, 5, 67-76.
-



- Wang, C.Y.** (1995b) Temperature preconditioning affects glutathione content and glutathione reductase activity in chilled zucchini squash. *Journal of Plant Physiology*, 145, 148-152.
- Wang, C.Y.** (1996) Temperature preconditioning affects ascorbate antioxidant system in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology*, 8, 29-36.
- Wang, C.Y. y Adams, D.O.** (1982) Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiology*, 69, 424-427.
- Wang, C.Y. y Buta, J.G.** (1994) Methyl jasmonate reduces chilling injury in *Cucurbita pepo* through its regulation of abscisic acid and polyamine levels. *Environmental and Experimental Botany*, 34, 427-432.
- Wang, C.Y. y Buta, J.G.** (1999) Methyl jasmonate improves quality of stored zucchini squash. *Journal of Food Quality*, 22, 663-670.
- Wang, C.Y. y Ji, Z.L.** (1989) Effect of low-oxygen storage on chilling injury and polyamines in zucchini squash. *Scientia Horticulturae*, 39, 1-7.
- Wang, G., Michailides, T.J. y Bostock, R.M.** (1997) Improved detection of polygalacturonase activity due to *Mucor piriformis* with a modified dinitrosalicylic acid reagent. *Phytopathology*, 87, 161-163.
- Wang, H., Qian, Z., Ma, S., Zhou, Y., Patrick, J.W., Duan, X., Jiang, Y. y Qu, H.** (2013) Energy status of ripening and postharvest senescent fruit of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *BMC plant biology*, 13, 55.
- Wang, L.-J. y Li, S.-H.** (2006) Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca<sup>2+</sup> homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Science*, 170, 685-694.
- Wang, S., Melnyk, J.P., Tsao, R. y Marcone, M.F.** (2011) How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, 44, 14-22.
- Wang, X.** (2001) Plant phospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 211-231.
- Wang, X.** (2002) Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 408-414.
- Wang, Y., Chen, J.-Y., Jiang, Y.-M. y Lu, W.-J.** (2007) Cloning and expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase in relation to chilling tolerance in harvested banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 34-41.
- Wang, Y., Luo, Z., Huang, X., Yang, K., Gao, S. y Du, R.** (2014) Effect of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) treatment on chilling injury and antioxidant capacity in banana peel. *Scientia Horticulturae*, 168, 132-137.
- Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., Webb, R. y Fuchigami, L.** (2005) Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130, 167-173.
- Wasternack, C. y Parthier, B.** (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science*, 2, 302-307.
- Wellburn, A.R.** (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307-313.



- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. y Ausubel, F.M.** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 562-565.
- Willekens, H., Inzé, D., Montagu, M. y Camp, W.** (1995) Catalases in plants. *Molecular Breeding*, 1, 207-228.
- Woolf, A.B., Cox, K.A., White, A. y Ferguson, I.B.** (2003) Low temperature conditioning treatments reduce external chilling injury of 'Hass' avocados. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 113-122.
- Xiong, L. y Zhu, J.-K.** (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 133, 29-36.
- Xu, P.-L., Guo, Y.-K., Bai, J.-G., Shang, L. y Wang, X.-J.** (2008) Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiologia Plantarum*, 132, 467-478.
- Xu, Y., Shi, G., Ding, C. y Xu, X.** (2011) Polyamine metabolism and physiological responses of *Potamogeton crispus* leaves under lead stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58, 460-466.
- Yahia, E.M., Contreras-Padilla, M. y González-Aguilar, G.** (2001) Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. *LWT-Food Science and Technology*, 34, 452-457.
- Yamauchi, N., Funamoto, Y. y Shigyo, M.** (2004) Peroxidase-mediated chlorophyll degradation in horticultural crops. *Phytochemistry Reviews*, 3, 221-228.
- Yang, A., Cao, S., Yang, Z., Cai, Y. y Zheng, Y.** (2011)  $\gamma$ -Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit. *Food Chemistry*, 129, 1619-1622.
- Yang, Q., Zhang, Z., Rao, J., Wang, Y., Sun, Z., Ma, Q. y Dong, X.** (2013a) Low-temperature conditioning induces chilling tolerance in 'Hayward' kiwifruit by enhancing antioxidant enzyme activity and regulating endogenous hormones levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n/a-n/a.
- Yang, Q., Zhang, Z., Rao, J., Wang, Y., Sun, Z., Ma, Q. y Dong, X.** (2013b) Low-temperature conditioning induces chilling tolerance in 'Hayward' kiwifruit by enhancing antioxidant enzyme activity and regulating endogenous hormones levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3691-3699.
- Yang, S.F. y Hoffman, N.E.** (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35, 155-189.
- Yi, C., Jiang, Y., Shi, J., Qu, H., Xue, S., Duan, X., Shi, J. y Prasad, N.K.** (2010) ATP-regulation of antioxidant properties and phenolics in litchi fruit during browning and pathogen infection process. *Food Chemistry*, 118, 42-47.
- Yi, C., Qu, H.X., Jiang, Y.M., Shi, J., Duan, X.W., Joyce, D.C. y Li, Y.B.** (2008) ATP-induced changes in energy status and membrane integrity of harvested litchi fruit and its relation to pathogen resistance. *Journal of Phytopathology*, 156, 365-371.
- Yoruk, R. y Marshall, M.R.** (2003) Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 361-422.
- Zhang, B., Xi, W.-p., Wei, W.-w., Shen, J.-y., Ferguson, I. y Chen, K.-s.** (2011) Changes in aroma-related volatiles and gene expression during low temperature
-





- storage and subsequent shelf-life of peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 7-16.
- Zhang, C. y Tian, S.** (2009) Crucial contribution of membrane lipids' unsaturation to acquisition of chilling-tolerance in peach fruit stored at 0°C. *Food Chemistry*, 115, 405-411.
- Zhang, C. y Tian, S.** (2010) Peach fruit acquired tolerance to low temperature stress by accumulation of linolenic acid and N-acylphosphatidylethanolamine in plasma membrane. *Food Chemistry*, 120, 864-872.
- Zhang, H., Yang, S., Joyce, D.C., Jiang, Y., Qu, H. y Duan, X.** (2010a) Physiology and quality response of harvested banana fruit to cold shock. *Postharvest Biology and Technology*, 55, 154-159.
- Zhang, J., Huang, W., Pan, Q. y Liu, Y.** (2005) Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) by heat pretreatment. *Postharvest Biology and Technology*, 38, 80-90.
- Zhang, X., Shen, L., Li, F., Zhang, Y., Meng, D. y Sheng, J.** (2010b) Up-regulating arginase contributes to amelioration of chilling stress and the antioxidant system in cherry tomato fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2195-2202.
- Zhang, Z., Nakano, K. y Maezawa, S.** (2009) Comparison of the antioxidant enzymes of broccoli after cold or heat shock treatment at different storage temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 54, 101-105.
- Zhao, D.Y., Shen, L., Fan, B., Liu, K.L., Yu, M.M., Zheng, Y., Ding, Y. y Sheng, J.P.** (2009) Physiological and genetic properties of tomato fruits from 2 cultivars differing in chilling tolerance at cold storage. *Journal of Food Science*, 74, C348-C352.
- Zhao, J., Zhou, D., Zhang, Q. y Zhang, W.** (2012) Genomic analysis of phospholipase D family and characterization of *GmPLDAs* in soybean (*Glycine max*). *Journal of plant research*, 125, 569-578.
- Zhao, M.-L., Wang, J.-N., Shan, W.E.I., Fan, J.-G., Kuang, J.-F., Wu, K.-Q., Li, X.-P., Chen, W.-X., He, F.-Y., Chen, J.-Y. y Lu, W.-J.** (2013) Induction of jasmonate signalling regulators MaMYC2s and their physical interactions with MaICE1 in methyl jasmonate-induced chilling tolerance in banana fruit. *Plant, Cell & Environment*, 36, 30-51.
- Zhao, R., Sheng, J., Lv, S., Zheng, Y., Zhang, J., Yu, M. y Shen, L.** (2011) Nitric oxide participates in the regulation of *LeCBF1* gene expression and improves cold tolerance in harvested tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 62, 121-126.
- Zhao, Z., Jiang, W., Cao, J., Zhao, Y. y Gu, Y.** (2006) Effect of cold-shock treatment on chilling injury in mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Wacheng') fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2458-2462.
- Zheng, Y., Fung, R.W., Wang, S.Y. y Wang, C.Y.** (2008) Transcript levels of antioxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini squash in response to superatmospheric oxygen. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 151-158.



### *Referencias bibliográficas*

---

- Zhou, H.-W., Dong, L.i., Ben-Arie, R. y Lurie, S.** (2001) The role of ethylene in the prevention of chilling injury in nectarines. *Journal of Plant Physiology*, 158, 55-61.