

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL



**Estudio metabólico y genético de los  
mecanismos implicados en la tolerancia al frío  
durante la postcosecha del fruto de calabacín**

Metabolomic and genomic study of the mechanisms involved in  
cold tolerance during postharvest period of zucchini fruit

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA  
FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS

Director: Francisco José Palma Martín

**Alejandro Castro Cegri**

TESIS DOCTORAL / DOCTORAL THESIS

2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Alejandro Castro Cegri  
ISBN: 978-84-1195-495-2  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/96706>



El trabajo presentado en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias, en la línea de investigación: Fisiología de la postcosecha en frutos de interés agronómico.

La financiación recibida por el doctorando proviene del Ministerio de Ciencia e Innovación mediante la concesión de un contrato (EEBB-PRE-C-2018-0057; 1 de Julio de 2019 a 30 de Junio de 2023) de “Formación de Personal Investigador” (FPI 2018), asociado al Proyecto de I+D+I (AGL2017-82885-C2-2-R) correspondiente al Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad FEDER.

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

## CONGRESOS

1. **Congreso de jóvenes investigadores en ciencias agroalimentarias.** Univesidad de Almería. Póster. 17/10/2019. Efecto de cubiertas naturales, solas o combinadas con glicerol, en la calidad del fruto de calabacín tras almacenamiento en frío. **Castro Cegrí, Alejandro;** Carvajal Moreno, Fátima; Ortega Muñoz, Mariano; Jiménez Muñoz, Raquel; Garrido Garrido, Dolores ;Palma Martín, Francisco José.
2. **6th international symposium on cucurbits**, Ghent (Belgium). Póster. 30/06/2019-04/07/2019. Effect of a dextrin-based coating, alone or enriched with oleuropein, on the quality of zucchini fruit after cold storage. Fátima Carvajal, **Alejandro Castro-Cegrí**, Mariano Ortega-Muñoz, Raquel Jiménez-Muñoz, Dolores Garrido, Francisco Palma.
3. **XIIth Eucarpia meeting on cucurbit genetics and breeding.** Almería (España). Póster. 24-28 de Mayo de 2021. Correlation between ABA and chilling tolerance in crosses of Cucurbita pepo varieties with contrasted behavior to cold storage. **Alejandro Castro-**

**Cegrí**, Francisco Palma, Jessica Iglesias-Moya, Fátima Carvajal, Raquel Jiménez-Muñoz, Manuel Jamilena, and Dolores Garrido.

4. **XIII Congreso Nacional y XI ibérico de maduración y postcosecha.** Zaragoza (España). Póster. 14-17 de Junio de 2022. Effect of exogenous riboflavin on postharvest cold tolerance of zucchini fruit. **Alejandro Castro-Cegrí**; Sandra Sierra; Rafael Pérez-Moraga; Laura Hidalgo-Santiago; Dolores Garrido; Francisco Palma.
5. **XIII Congreso Nacional y XI ibérico de maduración y postcosecha.** Zaragoza (España). Póster. 14-17 de Junio de 2022. Untargeted metabolomic analysis of zucchini fruit to unravel the role of ABA during cold storage. **Alejandro Castro-Cegrí**; Fátima Carvajal; Raquel Jiménez-Muñoz; Manuel Jamilena; Dolores Garrido; Francisco Palma.
6. **I Congreso Estatal de Estudiantes de Biociencias (CEEBI).** Granada (España). Ponencia. 19-22 de Julio de 2022. Fisiología de la postcosecha en frutos. **Alejandro Castro-Cegrí**.
7. **IX Congreso Ibérico y XVII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas.** Mérida (España). Póster. 5-9 de Junio de 2023. Extending the postharvest-shelf life of zucchini fruit using a dextrin-based coating and olive oil. **A. Castro-Cegrí**, S. Sierra, M. Ortega-Muñoz, F. Carvajal, L. Hidalgo-Santiago, D.Garrido, F. Palma.
8. **IX Congreso Ibérico y XVII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas.** Mérida (España). Oral. 5-9 de Junio de 2023. Unravelling the role of abscisic acid on the chilling stress of zucchini fruit during postharvest through a metabolome-wide perspective. **A. Castro-Cegrí**, P. García-Pérez, L. Lucini, M. Jamilena, F. Palma, D. Garrido.

## PUBLICACIONES

1. **Castro-Cegrí, A., Ortega-Munoz, M., Sierra, S., Carvajal, F., Santoyo-Gonzalez, F., Garrido, D., & Palma, F. (2023).** Application of polysaccharide-based edible coatings to improve the quality of zucchini fruit during postharvest cold storage. *Scientia Horticulturae*, 314, 111941.
2. **Castro-Cegrí, A., Sierra, S., Hidalgo-Santiago, L., Esteban-Muñoz, A., Jamilena, M., Garrido, D., & Palma, F. (2023).** Postharvest Treatment with Absciscic Acid Alleviates Chilling Injury in Zucchini Fruit by Regulating Phenolic Metabolism and Non-Enzymatic Antioxidant System. *Antioxidants*, 12(1), 211.
3. **Castro-Cegrí, A., Carvajal, F., Osorio, S., Jamilena, M., Garrido, D., & Palma, F. (2023).** Postharvest abscisic acid treatment modulates the primary metabolism and the biosynthesis of t-zeatin and riboflavin in zucchini fruit exposed to chilling stress. *Postharvest Biology and Technology*, 204, 112457.

## OTRAS PUBLICACIONES

4. **Jiménez-Muñoz, R., Palma, F., Carvajal, F., Castro-Cegrí, A., Pulido, A., Jamilena, M., Romero, M. & Garrido, D. (2021).** Pre-storage nitric oxide treatment enhances chilling tolerance of zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) by S-nitrosylation of proteins and modulation of the antioxidant response. *Postharvest Biology and Technology*, 171, 111345.
5. **Carvajal, F., Castro-Cegrí, A., Jiménez-Muñoz, R., Jamilena, M., Garrido, D., & Palma, F. (2021).** Changes in morphology, metabolism and composition of cuticular wax in Zucchini fruit during postharvest cold storage. *Frontiers in Plant Science*, 12, 778745.

### **ESTANCIA NACIONAL**

- Departamento de Biología y Geología, Universidad de Almería, Almería (España). Dr. Manuel Jamilena Quesada (1 de Marzo de 2021 hasta 30 de Abril de 2021, 2 meses)

### **ESTANCIA INTERNACIONAL**

- Department for Sustainable food process (DISTAS), Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza (Italia). Dr. Luigi Lucini (17 de Enero de 2023 a 28 de Abril de 2023, 3 meses y 11 días)

# ÍNDICE



# TABLA DE CONTENIDOS

|                                                                                                                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÍNDICE .....                                                                                                                                                                  | 1         |
| ABREVIATURAS .....                                                                                                                                                            | 9         |
| RESUMEN .....                                                                                                                                                                 | 13        |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....                                                                                                                                                  | 21        |
| 1.1. El fruto de calabacín .....                                                                                                                                              | 23        |
| <i>1.1.1. Origen y taxonomía .....</i>                                                                                                                                        | <i>23</i> |
| <i>1.1.2. Cultivo del calabacín y su importancia económica .....</i>                                                                                                          | <i>25</i> |
| 1.2. Calidad postcosecha del fruto .....                                                                                                                                      | 29        |
| <i>1.2.1. Alteraciones de la pared celular.....</i>                                                                                                                           | <i>31</i> |
| <i>1.2.2. Alteraciones de la membrana celular.....</i>                                                                                                                        | <i>33</i> |
| <i>1.2.3. Estrés oxidativo.....</i>                                                                                                                                           | <i>34</i> |
| 1.3. Mecanismos de defensa antioxidante .....                                                                                                                                 | 34        |
| 1.4. Avances en la mejora de la calidad postcosecha .....                                                                                                                     | 40        |
| 2. OBJETIVOS .....                                                                                                                                                            | 43        |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                   | 47        |
| 3.1. Material vegetal y experimentos realizados.....                                                                                                                          | 49        |
| <i>3.1.1. Aplicación de recubrimientos comestibles a base de polisacáridos<br/>para mejorar la calidad del fruto de calabacín durante el<br/>almacenamiento en frío .....</i> | <i>49</i> |
| <i>3.1.2. Implicación de la hormona ácido abscísico en la tolerancia al frío<br/>del fruto de calabacín .....</i>                                                             | <i>50</i> |
| <i>3.1.3. Efectos bioquímicos postcosecha de la aplicación exógena de<br/>riboflavina al fruto de calabacín durante su almacenamiento en frío .....</i>                       | <i>51</i> |

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.4. <i>Identificación de QTLs asociados a mecanismos fisiológicos de tolerancia al frío en el fruto de calabacín</i> ..... | 52 |
| 3.2. <i>Análisis fisiológico del fruto</i> .....                                                                              | 53 |
| 3.2.1. <i>Pérdida de peso</i> .....                                                                                           | 53 |
| 3.2.2. <i>Estimación del índice de daños por frío</i> .....                                                                   | 53 |
| 3.2.3. <i>Firmeza</i> .....                                                                                                   | 53 |
| 3.2.4. <i>Pérdida de electrolitos en membrana</i> .....                                                                       | 54 |
| 3.2.5. <i>Tasa respiratoria</i> .....                                                                                         | 54 |
| 3.3. <i>Determinaciones analíticas</i> .....                                                                                  | 55 |
| 3.3.1. <i>Peroxidación lipídica (TBARS)</i> .....                                                                             | 55 |
| 3.3.2. <i>Peróxido de hidrógeno</i> .....                                                                                     | 55 |
| 3.3.3. <i>Test de capacidad antioxidante</i> .....                                                                            | 56 |
| 3.3.4. <i>Fenoles libres totales</i> .....                                                                                    | 57 |
| 3.3.5. <i>Fenoles solubles totales</i> .....                                                                                  | 58 |
| 3.3.6. <i>Cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC</i> .....                                                           | 58 |
| 3.3.7. <i>Flavonoides</i> .....                                                                                               | 59 |
| 3.3.8. <i>Ascorbato total</i> .....                                                                                           | 60 |
| 3.3.9. <i>Carotenoides</i> .....                                                                                              | 60 |
| 3.3.10. <i>Aminoácidos</i> .....                                                                                              | 61 |
| 3.3.11. <i>Riboflavina, FMN y FAD</i> .....                                                                                   | 62 |
| 3.3.12. <i>Ácido abscísico, trans-zeatina y trans-zeatina ribosido</i> .....                                                  | 62 |
| 3.3.13. <i>Determinación de proteínas</i> .....                                                                               | 63 |
| 3.4. <i>Actividades enzimáticas</i> .....                                                                                     | 63 |
| 3.4.1. <i>Superóxido dismutasa</i> .....                                                                                      | 63 |
| 3.4.2. <i>Catalasa</i> .....                                                                                                  | 64 |

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.3. <i>Ascorbato peroxidasa</i> .....                                                                                                                                   | 65 |
| 3.4.4. <i>Fenilalanina amonio liasa</i> .....                                                                                                                              | 65 |
| 3.4.5. <i>Polifenol oxidasa y peroxidasa</i> .....                                                                                                                         | 66 |
| 3.5. <b>Análisis estadístico</b> .....                                                                                                                                     | 66 |
| 3.6. <b>Perfil de metabolitos primarios por GC-TOF-MS</b> .....                                                                                                            | 67 |
| 3.7. <b>Análisis metabolómico no dirigido</b> .....                                                                                                                        | 67 |
| 3.7.1. <i>Análisis mediante UPLC-QTOF/ESI-MS (Cap.II)</i> .....                                                                                                            | 67 |
| 3.7.2. <i>Análisis mediante UPLC-QTOF/ESI-MS (Cap.IV)</i> .....                                                                                                            | 68 |
| 3.8. <b>Análisis de asociación de genes a fenotipo</b> .....                                                                                                               | 70 |
| 3.8.1. <i>Contrucción de bulk de ADN</i> .....                                                                                                                             | 70 |
| 3.8.2. <i>Secuenciación del genoma (WGS)</i> .....                                                                                                                         | 70 |
| 3.8.3. <i>Análisis BSAsseq</i> .....                                                                                                                                       | 71 |
| 3.8.4. <i>Análisis genotípico de las regiones diana</i> .....                                                                                                              | 71 |
| 3.8.5. <i>Anotación de las variantes</i> .....                                                                                                                             | 72 |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....                                                                                                                                     | 73 |
| <b>Capítulo I. Aplicación de recubrimientos comestibles a base de polisacáridos para mejorar la calidad del fruto de calabacín durante el almacenamiento en frío</b> ..... | 75 |
| I.1 <b>Introducción</b> .....                                                                                                                                              | 77 |
| I.2 <b>Resultados</b> .....                                                                                                                                                | 81 |
| I.2.1. <i>Selección de una cubierta polisacarídica para mantener la calidad del fruto de calabacín</i> .....                                                               | 81 |
| I.2.2. <i>Influencia de aditivos en la cubierta de dextrina para la tolerancia al frío del fruto de calabacín</i> .....                                                    | 84 |
| I.2.3. <i>Marcadores de estrés oxidativo</i> .....                                                                                                                         | 86 |

|                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>I.2.4. Actividades enzimáticas antioxidantes</i> .....                                                                                                                                           | 87  |
| <i>I.2.5. Antioxidantes no enzimáticos</i> .....                                                                                                                                                    | 89  |
| <i>I.2.6. Enzimas con función oxidativa de compuestos fenólicos</i> .....                                                                                                                           | 90  |
| <b>I.3 Discusión</b> .....                                                                                                                                                                          | 92  |
| <b>Capítulo II. El tratamiento con ácido abscísico modula el metabolismo primario y la biosíntesis de t-zeatina y riboflavina en fruto de calabacín expuesto a estrés por frío</b> .....            | 99  |
| <b>II.1 Introducción</b> .....                                                                                                                                                                      | 101 |
| <b>II.2 Resultados</b> .....                                                                                                                                                                        | 103 |
| <i>II.2.1. ABA y calidad postcosecha</i> .....                                                                                                                                                      | 103 |
| <i>II.2.2. Efecto del ABA en el perfil de metabolismo primario</i> .....                                                                                                                            | 103 |
| <i>II.2.3. Perfil metabólico no dirigido</i> .....                                                                                                                                                  | 111 |
| <i>II.2.4. Mapeo de rutas metabólicas</i> .....                                                                                                                                                     | 114 |
| <i>II.2.5. Cuantificación de compuestos provenientes del análisis de rutas alteradas por el ácido abscísico</i> .....                                                                               | 117 |
| <b>II.3 Discusión</b> .....                                                                                                                                                                         | 120 |
| <b>Capítulo III. Regulación del metabolismo fenólico y el sistema antioxidante no enzimático en fruto de calabacín mediante la aplicación de ácido abscísico durante la frigoconservación</b> ..... | 127 |
| <b>III.1 Introducción</b> .....                                                                                                                                                                     | 129 |
| <b>III.2 Resultados</b> .....                                                                                                                                                                       | 131 |
| <i>III.2.1. Efecto del ABA en antioxidantes no enzimáticos</i> .....                                                                                                                                | 131 |
| <i>III.2.2. Implicación del ABA en la ruta de los fenilpropanoides</i> .....                                                                                                                        | 133 |
| <i>III.2.3. Papel del ABA modulando enzimas oxidantes de fenoles</i> .....                                                                                                                          | 135 |
| <i>III.2.4. Efecto del ABA sobre la síntesis de fenoles</i> .....                                                                                                                                   | 136 |

|                                                                                                                                                         |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| III.3 Discusión .....                                                                                                                                   | 140        |
| <b>Capítulo IV. Efectos bioquímicos postcosecha de la aplicación exógena de riboflavina al fruto de calabacín durante su almacenamiento en frío ...</b> | <b>147</b> |
| IV.1 Introducción .....                                                                                                                                 | 149        |
| IV.2 Resultados .....                                                                                                                                   | 152        |
| <i>IV.2.1. Evaluación de los parámetros de calidad postcosecha .....</i>                                                                                | <i>152</i> |
| <i>IV.2.2. Antioxidantes no enzimáticos .....</i>                                                                                                       | <i>155</i> |
| <i>IV.2.3. Enzimas relacionadas con compuestos fenólicos .....</i>                                                                                      | <i>156</i> |
| <i>IV.2.4. Efecto del almacenamiento en frío y tratamiento con riboflavina en el perfil metabólico por estadística multivariante.....</i>               | <i>157</i> |
| IV.3 Discusión .....                                                                                                                                    | 161        |
| <b>Capítulo V. Identificación de QTLs asociados a mecanismos fisiológicos de tolerancia al frío en el fruto de calabacín .....</b>                      | <b>167</b> |
| V.1 Introducción .....                                                                                                                                  | 169        |
| V.2 Resultados .....                                                                                                                                    | 172        |
| <i>V.2.1. Evaluación de los parámetros de calidad postcosecha.....</i>                                                                                  | <i>172</i> |
| <i>V.2.2. Implicación de QTLs en la tolerancia al frío durante el periodo postcosecha del fruto de calabacín .....</i>                                  | <i>176</i> |
| <i>V.2.3. Validación de los QTLs por análisis de cosegregación .....</i>                                                                                | <i>180</i> |
| <i>V.2.4. Análisis de las regiones genómicas identificadas: Distribución de SNP y posibles genes candidatos .....</i>                                   | <i>184</i> |
| V.3 Discusión .....                                                                                                                                     | 188        |
| <b>5. CONCLUSIONES.....</b>                                                                                                                             | <b>193</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                                                                                                             | <b>199</b> |



# ABREVIATURAS

## **A**

|      |                                                |
|------|------------------------------------------------|
| A    | Almidón                                        |
| AA   | Ascorbato                                      |
| ABA  | Ácido abscísico                                |
| ABTS | 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazol-6-sulfónico) |
| ADN  | Ác. desoxirribonucleico                        |
| ARN  | Ác. ribonucleico                               |

## **B**

|       |                         |
|-------|-------------------------|
| β-Gal | β-galactosidasa         |
| BSA   | Bulk segregant analysis |
| Bulk  | Grupo de plantas        |

## **C**

|                 |                      |
|-----------------|----------------------|
| CAT             | Catalasa             |
| CI              | Daños por frío       |
| CMC             | Carboximetilcelulosa |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono   |
| Cx              | Celulosa             |

## **D**

|      |                               |
|------|-------------------------------|
| D    | Dextrina                      |
| DA   | Dextina+Aceite                |
| DHA  | Dehidroascorbato              |
| DHAR | Dehidroascorbato reductasa    |
| DO   | Dextrina+Oleuropeína          |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo |
| DTT  | Ditiotreitol                  |

## **E**

|                 |                               |
|-----------------|-------------------------------|
| EC <sub>M</sub> | Conductividad máxima          |
| EC <sub>0</sub> | Conductividad del medio       |
| EDTA            | Ác. Etilendiaminotetraacético |

## **F**

|      |                                                                        |
|------|------------------------------------------------------------------------|
| FAO  | Organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura |
| FAD  | Dinucleótido de flavina-adenina                                        |
| FMN  | Mononucleótido de flavina                                              |
| FMOC | 9-fluoroenilmetil cloroformato                                         |
| FRAP | Ferric Reducing Antioxidant Power                                      |

## **G**

|      |                                                         |
|------|---------------------------------------------------------|
| GABA | Ác. γ-aminobutírico                                     |
| GBS  | Genotipado basado en secuenciación                      |
| GRAS | Sustancias seguras para su uso como aditivo alimentario |
| GWAS | Estudio de asociación del genoma completo               |

## **H**

|                               |                                         |
|-------------------------------|-----------------------------------------|
| HCA                           | Análisis de agrupamiento no supervisado |
| HCl                           | Ác. Clorhídrico                         |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrógeno                   |
| HPLC                          | Cromatografía líquida de alta presión   |
| HR                            | Humedad relativa                        |

## **M**

|       |                                |
|-------|--------------------------------|
| MDA   | Malondialdehído                |
| MDHA  | Monodehidroascorbato reductasa |
| MDHAR | Monodehidroascorbato reductasa |
| MetPA | Análisis de rutas metabólicas  |
| Mt    | Millones de toneladas          |
| 1-MCP | 1-metilciclopropeno            |

## **N**

|         |                                          |
|---------|------------------------------------------|
| N       | Natura                                   |
| NAD(P)H | Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato |

## **O**

|                             |                   |
|-----------------------------|-------------------|
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Anión superóxido  |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub> | Oxígeno singlete  |
| OH <sup>-</sup>             | Radical hidroxilo |
| OPA                         | o-ftalaldehído    |

## **P**

|        |                                                       |
|--------|-------------------------------------------------------|
| PAL    | Fenilalanina amonio liasa                             |
| PCA    | Análisis de componentes principales                   |
| PCR    | Reacción en cadena de la polimerasa                   |
| PG     | Poligalacturonasa                                     |
| PL     | Pectato liasa                                         |
| PLS-DA | Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales |
| PME    | Pectin metilesterasa                                  |
| POD    | Peroxidasa                                            |
| PPO    | Polifenol oxidasa                                     |

## **Q**

|     |                          |
|-----|--------------------------|
| Q   | Quitano                  |
| QTL | Quantitative trait locus |

## **R**

|     |                                |
|-----|--------------------------------|
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
|-----|--------------------------------|

## **S**

|     |                                    |
|-----|------------------------------------|
| S   | Sinatra                            |
| SNP | Polimorfismo de un solo nucleótido |
| SOD | Superóxido dismutasa               |

## **T**

|      |                                     |
|------|-------------------------------------|
| TCA  | Ciclo de los ácidos tricarboxílicos |
| TPTZ | 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triacina    |

## **W**

|     |                         |
|-----|-------------------------|
| WGS | Whole genome sequencing |
| WL  | Pérdida de peso         |

## **X**

|     |                                  |
|-----|----------------------------------|
| XEH | Xiloglucano hidrolasa            |
| XET | Xiloglucano endotransglicosidasa |



**RESUMEN**

***SUMMARY***



*Cucurbita pepo* es una especie nativa de América, aunque hoy en día es cultivada en todo el mundo, siendo una de las especies con mayor variabilidad en el reino vegetal. *C. pepo* morfotipo zucchini es uno de los cultivos hortícolas más importantes en España, siendo Andalucía la región con mayor producción. La mayor parte de esta producción es exportada a Europa para consumo en fresco, donde los consumidores demandan una calidad cada vez más alta, lo que hace que sea necesaria una conservación apropiada, durante el periodo postcosecha, para mantener la calidad del fruto hasta que llegue al consumidor. El fruto de calabacín es cosechado en un estadio inmaduro, por ello su metabolismo continúa siendo muy rápido, haciendo necesario almacenarlo a bajas temperaturas para reducir su tasa respiratoria y prevenir el deterioro del fruto. Sin embargo, debido a su origen subtropical, la conservación a bajas temperaturas puede inducir en el fruto un síndrome conocido como daños por frío “chilling injury” (CI), que aparece como resultado de numerosas alteraciones fisiológicas y bioquímicas. Estos daños por frío son los responsables de la pérdida de calidad en el fruto, causando unas pérdidas económicas severas. Para mejorar o mantener la calidad del fruto durante el almacenamiento en frío, hemos llevado a cabo estudios sobre tratamientos físicos y químicos que pueden mejorar la conservación del fruto tras la cosecha, con especial interés en tratamientos que pueden prevenir los daños por frío.

El uso de cubiertas comestibles ha surgido como una respuesta a una demanda creciente de métodos que sean ecológicamente respetuosos con el medio ambiente para mantener la calidad del fruto durante el almacenamiento. De entre las diferentes cubiertas polisacarídicas estudiadas, la dextrina ha probado ser la más efectiva en el mantenimiento de la calidad postcosecha de calabacín durante el almacenamiento en frío. Posteriormente, para mejorar estos resultados, se testó la combinación de dextrina con oleuropeína y aceite de oliva, aditivos con función protectora y nutracéutica. Los resultados mostraron que las cubiertas de dextrina redujeron la pérdida de peso, los daños

por frío, y el estrés oxidativo en fruto de calabacín almacenado a bajas temperaturas, manteniendo la calidad del fruto. Los aditivos naturales obtenidos del olivo provocaron una mayor inducción de enzimas antioxidantes, así como también una acumulación de ascorbato y fenoles totales, siendo la cubierta de dextrina con aceite de oliva la más efectiva frente al índice de daños por frío hasta el final del almacenamiento, asociado con el metabolismo fenólico.

En un trabajo previo, se ha descrito que una variedad tolerante al frío de calabacín acumuló altas concentraciones de ácido abscísico (ABA) en los primeros días de almacenamiento en frío, por ello se decidió estudiar el efecto de la aplicación de ABA en el metabolismo del fruto de calabacín frente al estrés por frío. Se encontró que el ABA modula el metabolismo primario, induciendo la acumulación de algunos azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, incluyendo fenilalanina, ácido glutámico y ácido  $\gamma$ -aminobutírico, siendo todas ellas moléculas involucradas en la tolerancia a las bajas temperaturas. La aplicación de ABA también incrementa la capacidad antioxidante del fruto de calabacín durante el almacenamiento a través de una acumulación de ascorbato, carotenoides y compuestos polifenólicos, activando además la producción de flavonoides en el primer día de exposición a bajas temperaturas, siendo clave esta acumulación de metabolitos antioxidantes para evitar la incidencia de daños por frío. Además, se pudo observar que el tratamiento con ABA activa la biosíntesis de t-zeatina y riboflavina durante los primeros días de almacenamiento en frío, por lo que estos metabolitos son candidatos de ser señales moleculares importantes en la respuesta al frío mediada por ABA para inducir tolerancia al frío en el fruto de calabacín, activando la defensa antioxidante a través de la ruta de fenilpropanoides. Además, una de las hipótesis es que el ABA podría regular la ruta fenilpropanoide induciendo la síntesis de riboflavina.

Finalmente, para descifrar los mecanismos genéticos que subyacen a la tolerancia al frío, dos variedades contrastantes para este rasgo se cruzaron para

generar una población segregante. El estudio de asociación del genoma completo (GWAS) permitió identificar 2 regiones implicadas en la tolerancia al frío (QTLs), una en el cromosoma 5 y otra en el 18. Investigando la anotación de los genes presentes en dichas regiones algunos de ellos se identificaron como candidatos para ser los responsables del fenotipo, involucrados principalmente en el mantenimiento de la cutícula, respuesta fitohormonal y síntesis de metabolitos relacionados con estrés, como el ácido siquímico o poliaminas. Este estudio permitió además determinar marcadores KASP para cada región de interés.

En conclusión, el uso de cubiertas comestibles como dextrina, o la aplicación de tratamientos como ABA o riboflavina, mantienen la calidad postcosecha del fruto de calabacín durante su conservación a bajas temperaturas, haciendo factible el transporte y comercialización del fruto por las compañías hortofrutícolas. Además, los marcadores KASP diseñados para cada QTL pueden utilizarse en futuros programas de mejora, permitiendo el desarrollo de nuevas variedades de calabacín con mayor tolerancia al estrés por frío.

*Cucurbita pepo* is a native species of America, although nowadays it is cultivated worldwide and is one of the most variable species in the plant kingdom. *C. pepo* morphotype zucchini is specifically one of the most important horticultural crops in Spain, being Andalucía the region with the highest production in this commodity. Most of this production is exported to Europe for fresh consumption, where consumers increasingly demand an extra quality, which makes proper postharvest storage of the fruit necessary to maintain its quality until it reaches the consumer. Zucchini fruit is harvested in an immature state, so its metabolism is still very fast, making it necessary to store it at low temperatures to reduce its respiratory rate and to prevent fruit decay. However, due to its subtropical origin, the conservation at low temperature may induce in the fruit a syndrome known as chilling injury, that appears as a result of numerous physiological and biochemical alterations. These chilling injuries are responsible for a loss of quality in the fruit and cause serious economic losses. To improve or retain fruit quality during cold storage, we have undergone studies about physical and chemical treatments that can improve the conservation of the fruit after harvest, with special focus on treatments that can prevent chilling injuries.

The use of edible coatings has surged as a response to the ever-increasing demand for ecologically friendly methods for maintaining fruit quality during storage. Among the different polysaccharide-based coatings studied, dextrin has shown to be the most effective in maintaining the postharvest quality of zucchini fruit during cold storage. Subsequently, to improve these results, the nutraceutical additives oleuropein and olive oil, were tested in combination with dextrin. Results showed that dextrin coatings reduced weight loss, chilling injury, and oxidative stress in zucchini fruit stored at low temperature, maintaining fruit quality. The natural additives obtained from the olive tree showed a higher induction of antioxidant enzymes as well as a greater accumulation of ascorbate and total phenolics, with the dextrin

coating with olive oil being even more effective in maintaining the chilling injury low until the end of storage, associated to phenolic metabolism.

In a previous work, it has been described that a cold-tolerant zucchini variety accumulated high amounts of abscisic acid (ABA) in the first days of cold storage, so the effect of ABA application on the cold tolerance of zucchini fruit was studied using a metabolomic approach. It was found that ABA modulates the primary metabolism inducing the accumulation of some sugars, organic acids and amino acids including phenylalanine, glutamic acid and  $\gamma$ -aminobutyric acid, all of them molecules involved in low-temperature tolerance. The application of ABA also increases the antioxidant capacity of zucchini fruit during storage through the accumulation of ascorbate, carotenoids, and polyphenolic compounds, mainly activating the production of flavonoids during the first day of exposure to low temperatures, being this response key to avoiding the occurrence of chilling injury. It was also observed that ABA treatment activates the t-zeatin and riboflavin biosynthesis during the first days of cold storage, making these metabolites candidates to be important molecular signals in the ABA-mediated cold response to induce tolerance in zucchini fruit. To go deeper into the response to ABA, zucchini fruit were treated with exogenous riboflavin. This treatment also increased the cold tolerance of zucchini fruit, activating antioxidant defense through the phenylpropanoid pathway. Therefore, one of the hypotheses is that ABA could regulate the phenylpropanoid pathway inducing the synthesis of riboflavin.

Finally, in order to unravel the genetic mechanisms underlying cold tolerance in zucchini fruit, two zucchini varieties with contrasting degree of chilling sensitivity were crossed to obtain a segregating population. The genome wide association analysis showed 2 quantitative trait loci (QTLs) involved in cold tolerance, one in chromosome 5 and the other in chromosome 18. Some of the annotated genes in these regions were identified as candidates to be responsible of cold tolerance in zucchini fruit, mainly involved in cuticle maintenance, phytohormone responses, and the synthesis of stress-related

metabolites, such as shikimic acid or polyamines. This approach also allowed to determine KASP markers for each region of interest.

In conclusion, the use of edible coatings such as dextrin, or the application of treatments like ABA or riboflavin, maintains the postharvest quality of zucchini fruit during its conservation at low temperatures, allowing the transport and marketing of the fruit by companies. Furthermore, KASP markers designed for each QTL can be used in future genetic improvement programs, allowing to develop new varieties of zucchini with greater tolerance to cold stress.

# **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1.1. El fruto de calabacín

### 1.1.1. Origen y taxonomía

El calabacín (*Cucurbita Pepo* subsp *pepo*) es una especie económicamente importante de la familia *Cucurbitaceae*, que comprende aproximadamente 130 géneros y unas 800 especies (Jeffrey, 2005). 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 (Esteras et al., 2011; Jeffrey, 2005), algunas de las cuales tienen gran importancia económica por sus frutos (Fig.1.1), como es el caso de la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mat. & Nak.), el melón (*Cucumis melo* L.), el pepino (*Cucumis sativus* L.), la calabaza (*Cucurbita maxima* Duch., *Cucurbita moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. & Poir y *Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo*) y el calabacín (*Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo*).

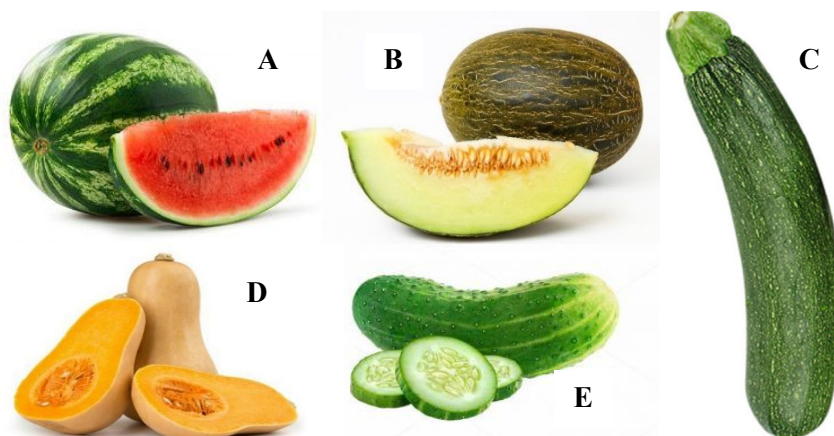
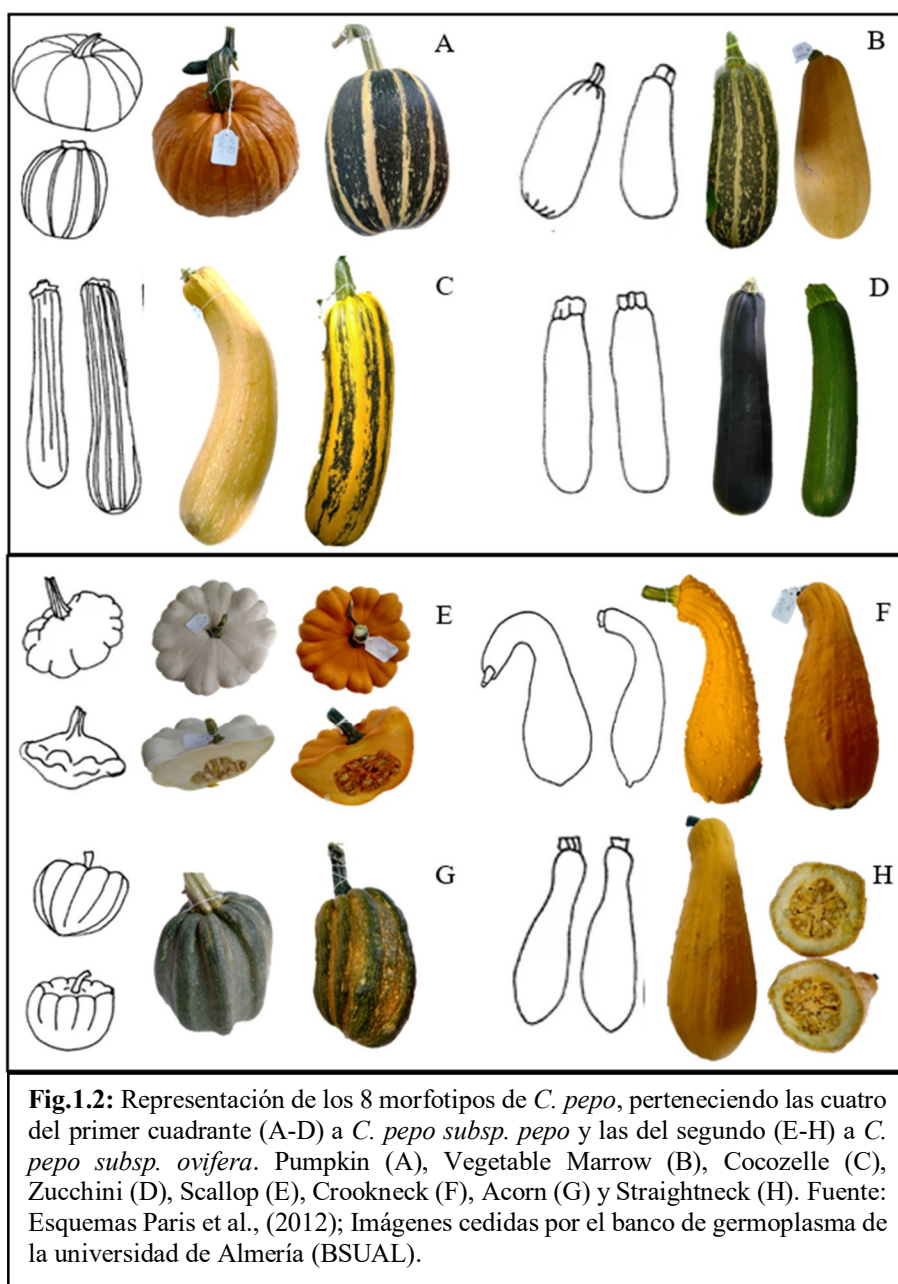


**Figura 1.1:** Especies económicamente importantes de familia *Cucurbitaceae*: (A) Sandía (*Citrullus lanatus*), (B) Melón (*Cucumis melo*), (C) Calabacín (*Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo*, morfotipo Zucchini), (D) Calabaza (*Cucurbita moschata*), (E) Pepino (*Cucumis sativus*).

El calabacín es originario de América, datándose su introducción en Europa a principios del siglo XVI. Han existido dos eventos de domesticación independientes de *C. pepo*, uno en el sur de México y otro en el este de Estados Unidos (Paris et al., 2012; Smith, 2006). Cada uno dio origen a las dos

subespecies cultivables, *ssp. pepo* y *ssp. ovifera*. Dentro de *C. pepo ssp. pepo*, se encuentran los morfotipos Pumpkin, Cocozelle, Vegetable marrow y Zucchini, que es al que corresponde el calabacín, mientras que dentro de *C. pepo subsp. ovifera* se encuentran los morfotipos Scallop, Acorn, Crookneck y Straightneck (Ferriol et al., 2003; Paris et al., 2003; Paris et al., 2012).



### 1.1.2. Cultivo del calabacín y su importancia económica

#### 1.1.2.1. Situación a nivel mundial

La producción mundial de calabacín y calabaza ha seguido una tendencia creciente desde los años 70-80 hasta ahora, llegando a mostrar el máximo en producción en el año 2017 con 26.6 millones de toneladas (Mt). Sin embargo, se produjo un descenso del 27 % en área cultivada, principalmente en China, en el año 2018, lo que redujo en un 17.5 % la producción de estos cultivos, cayendo ese año a 21.9 Mt. El porcentaje de reducción en producción no disminuyó de manera proporcional, probablemente porque el área cultivada que se eliminó sería de baja producción. Posteriormente ha continuado una tendencia creciente en tanto en área cultivada como en producción llegando a producirse 23.8 Mt en 2021 (Fig.1.3) (FAOSTAT, 2023).

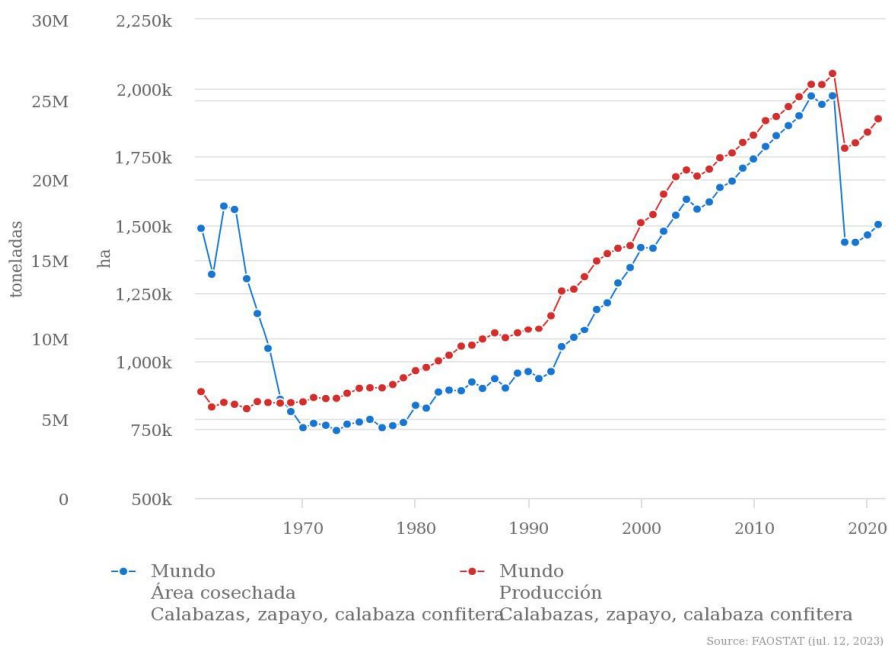


**Fig.1.3:** Evolución histórica de producción y área cosechada total mundial del grupo en que se incluye calabacín (Calabazas, zapayo y calabaza confitera). Fuente: Departamento de estadística de la FAO (FAOSTAT, 2023).

El cultivo de calabacín y calabaza está muy repartido a nivel global, siendo China el principal productor con diferencia de estas especies hortícolas, produciendo 7.4 Mt en 2021 (Fig.1.4). El resto de países que se encuentran en el top 10 como máximos productores presentan unas cantidades anuales más cercanas entre ellos, encontrándose España en el 5º puesto con 790 mil toneladas (80 % calabacín), siendo el principal productor de la Unión Europea, por delante de países como Turquía, México o Italia (Fig.1.4) (FAOSTAT, 2023).

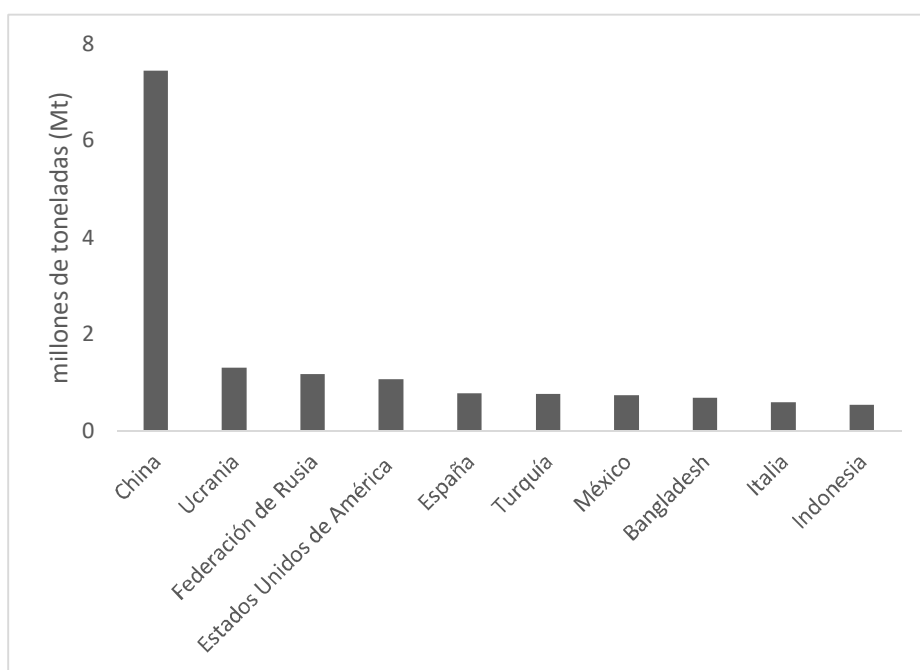


**Fig.1.4:** Países con mayor producción en 2021 de calabacín y calabaza. Fuente: Departamento de estadística de la FAO (FAOSTAT, 2023).

De las toneladas producidas en España la mayor parte se destina a exportación, lo que convierte a nuestro país en el segundo principal exportador mundial sólo un poco por detrás de México. Sin embargo, debido a que España consigue un mayor valor por Kg de fruto se convierte en el primer exportador mundial de calabacín y calabaza en términos de valor económico (Fig.1.5) (FAOSTAT, 2023). Este mayor valor por Kg se debe a que los principales

importadores de calabacín español son países europeos, con una capacidad de producción muy baja y poder adquisitivo alto.

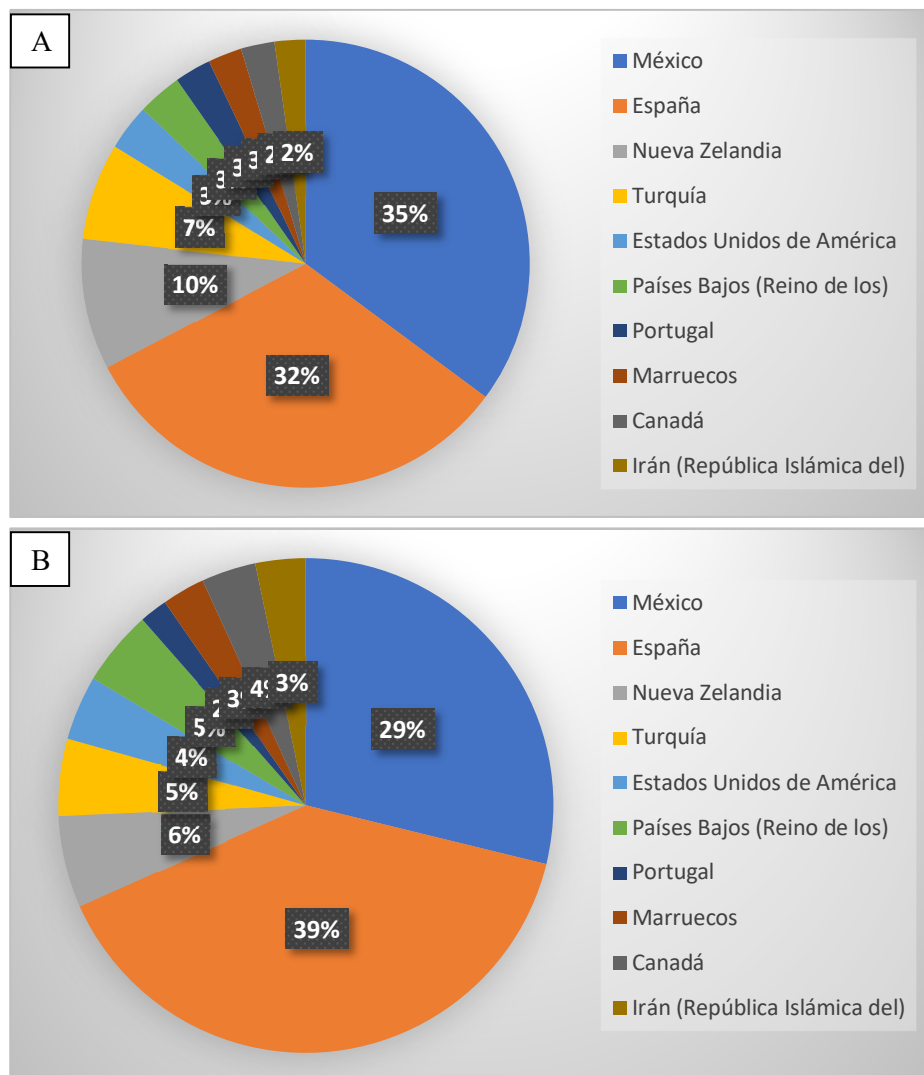


**Fig.1.5:** Principales exportadores del grupo que comprende calabacín y calabaza en 2021, en cantidad (A) y valor económico (B). Departamento de estadística de la FAO (FAOSTAT, 2023).

#### 1.1.2.2. Situación del cultivo en España

En España la tendencia, tanto de área cultivada como de producción, ha sido creciente desde la introducción de este cultivo destinado a la

exportación en los años 80, mostrando cada año que pasa un nuevo récord en máximo histórico de producción desde 2014, alcanzando en 2022 una producción de calabacín de 618 mil toneladas (Fig.1.6). Siendo Andalucía la comunidad autónoma con mayor producción (513 mil toneladas), debido principalmente al cultivo en Almería (93.5 % del total) (mapa.gob, 2023).

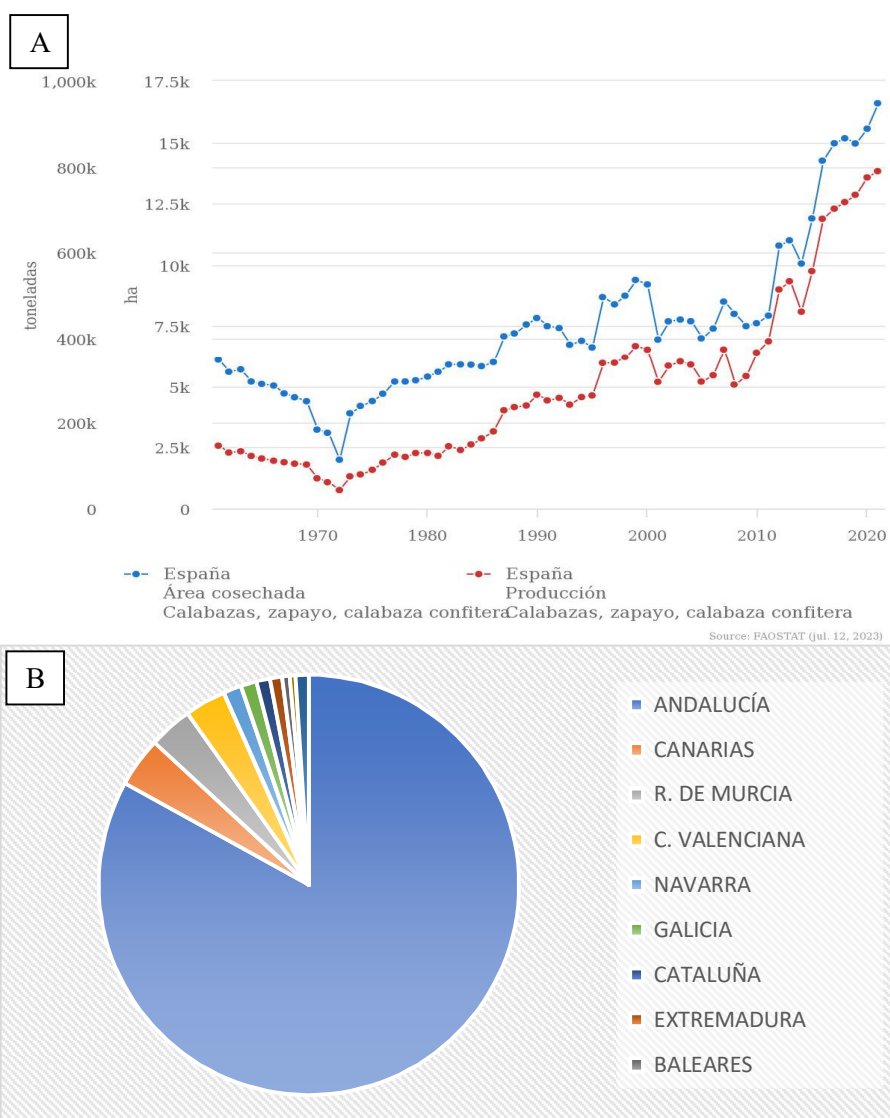


**Fig.1.6:** Producción de calabacín en 2021 en España. (A) Área cosechada y producción total en el país, (B) Contribución de cada comunidad autónoma en la producción respecto al total. Fuente: Departamentos de estadística de la FAO (FAOSTAT, 2023) y del Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (mapa.gob, 2023).

De la producción total de calabacín en España, 307 mil toneladas se destinaron para exportación en el año 2022, acaparando entre Francia y Alemania más del 50 % del volumen de exportación (FEPEX, 2023).

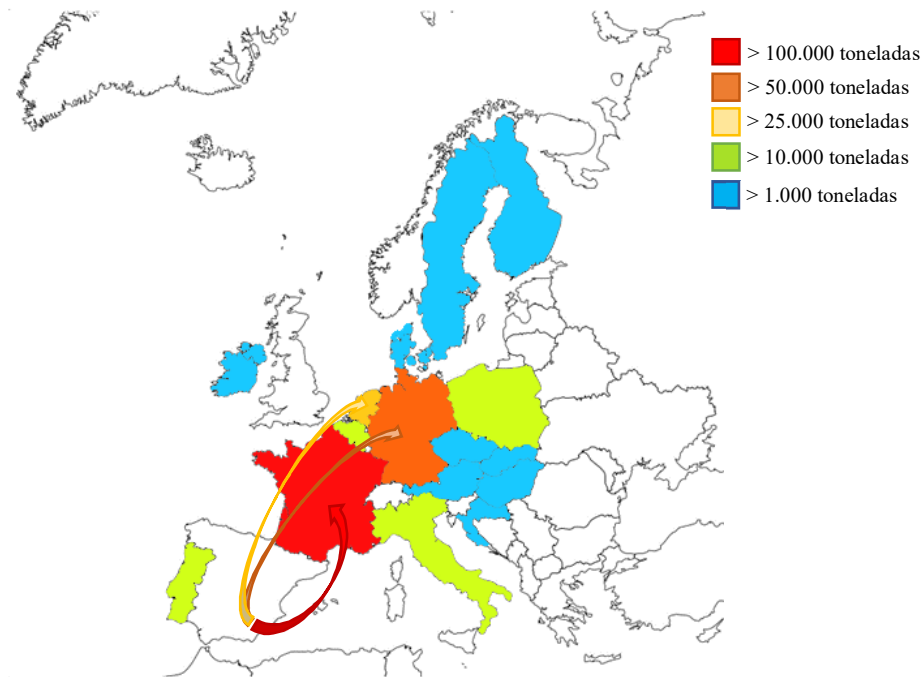


**Fig.1.7:** Mapa de exportación de calabacín a países de la UE durante 2022. Elaboración propia, fuente: FEPEX, 2023 (Federación española de productores y exportadores de frutos, vegetales, flores y plantas vivas).

## 1.2. Calidad postcosecha del fruto

El creciente consumo de frutas y hortalizas alrededor del mundo ha dado lugar a una búsqueda de las mejores condiciones de almacenamiento y transporte, lo que es crucial para mantener la calidad del fruto durante el periodo postcosecha (Brummell and Harpster, 2001). Comprender como ocurre la pérdida de calidad en el fruto, durante el periodo postcosecha, es el primer paso para evitar el deterioro de esta materia prima. El almacenamiento a baja temperatura es un método ampliamente utilizado para mantener la calidad de

los frutos durante su postcosecha (Kader, 2003). Esta técnica, es utilizada en frutos como el calabacín para ralentizar su metabolismo, debido a que su recolección ocurre en una etapa previa a la madurez del fruto, y, por lo tanto, presenta una tasa metabólica muy elevada, lo que conlleva a una alta respiración y transpiración (Valenzuela et al., 2017). Sin embargo, debido al origen subtropical de este fruto (*Cucurbita pepo*), cuando es almacenado a baja temperatura un desorden fisiológico denominado **daños por frío** aparece (Fig.1.8).

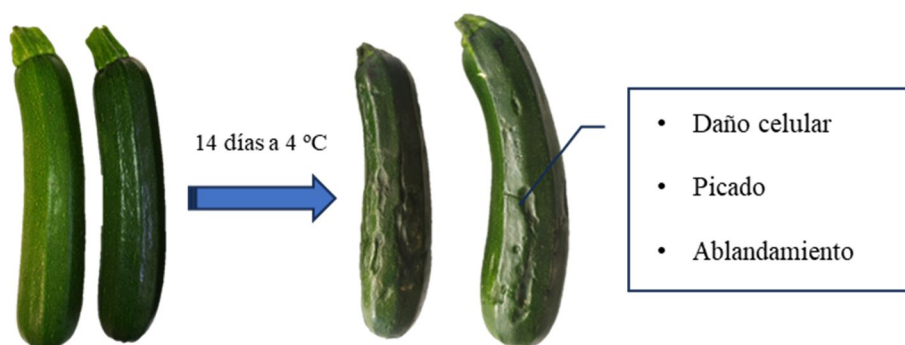


**Fig.1.8:** Daños sufridos por el fruto de calabacín debido al estrés por frío que provoca el almacenamiento durante 14 días a 4 °C.

En este desorden fisiológico están involucradas una elevada variedad de alteraciones fisiológicas y bioquímicas afectando al metabolismo del fruto, como modificación en la composición y estructura de la pared celular y la membrana plasmática, respuesta frente a estrés oxidativo y cambios en los niveles de fitohormonas y reguladores del crecimiento, así como de metabolitos implicados en la tolerancia al frío (Carvajal et al., 2011; Carvajal et al., 2015b). Sin embargo, cada variedad de calabacín responde de diferente manera frente a este estrés, por ello los daños por frío en el fruto de calabacín son dependientes de la variedad (Fig.1.9) (Carvajal et al., 2011; Megías et al., 2016a). Los síntomas de daños por frío más comunes en fruto de calabacín son pérdida de

peso, ablandamiento y aparición de daños en la superficie del fruto, principalmente picado y hundimiento del tejido, estos cambios macroscópicos en conjunto se utilizan para evaluar el índice de daños por frío (Carvajal et al., 2011; Martínez-Téllez et al., 2002; Megías et al., 2015).

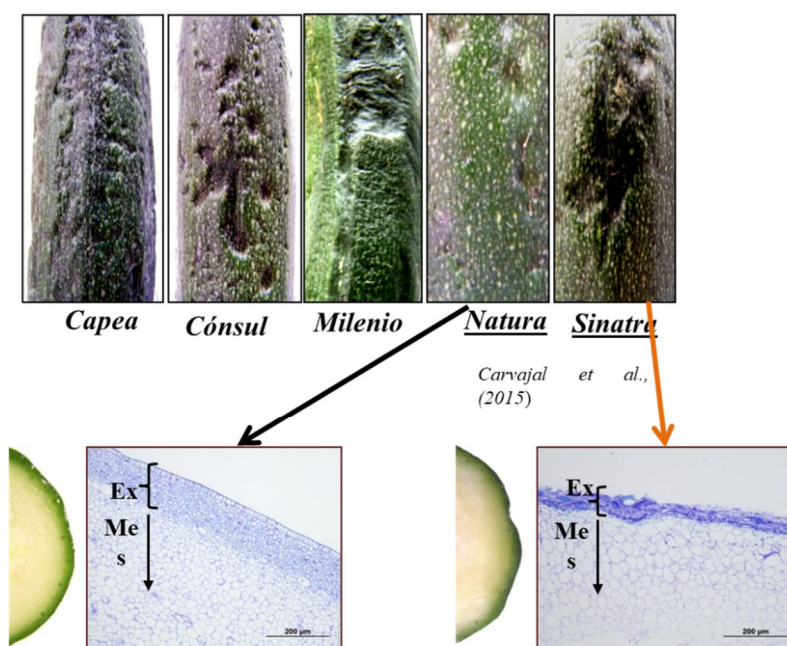


**Fig.1.9:** Diferente respuesta de variedades comerciales de calabacín frente al almacenamiento a bajas temperaturas (Carvajal et al., 2015b).

Tras realizar un análisis microscópico de este picado, se ha demostrado que las depresiones que se producen en el fruto se deben a la muerte y colapso celular del exocarpo, por cambios en actividades enzimáticas que dan lugar a solubilización de las pectinas y degradación de la pared celular (Carvajal et al., 2015b).

### ***1.2.1. Alteraciones de la pared celular***

La degradación de la pared celular se produce debido a que el metabolismo de las células se ve alterado por la exposición a bajas temperaturas, produciendo cambios en los principales componentes de la pared celular como las pectinas (polímeros de ácido poligalacturónico), celulosas y

hemicelulosas. Estos cambios están íntimamente relacionados con la acción de las enzimas modificadoras de la pared celular, pectin metilesterasas (PME), poligalacturonasas (PG), pectato liasa (PL), celulasa (Cx),  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) y xiloglucano endotransglicosidasa/hidrolasa (XET; XEH) (Carvajal et al., 2015b; Fan et al., 2019; Lin et al., 2019).

Las **pectin metilesterasas** (PME, EC 3.1.1.11) actúan sobre las pectinas, llevando a cabo una demetil esterificación de los compuestos metilpoligalacturonatos y generando por tanto poligalacturonatos, que son el sustrato para las **poligalacturonasas** (PG, EC 3.2.2.15), que catalizan la rotura de los enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicos del poligalacturonato (Lazan et al., 1989; Pelloux et al., 2007). PME y PG se han descrito como las principales enzimas de degradación de pared celular durante la postcosecha, dando lugar al ablandamiento del fruto, como se ha demostrado también en una elevada variedad de frutos hortícolas (Sevillano et al., 2009), así como en melocotón (Wang et al., 2022) o papaya (Tao and Pan, 2023). Las **pectato liasas** (PL, EC 4.2.2.2) catalizan la rotura de pectinas esterificadas, que son el componente mayoritario de la pared celular primaria (Carpita and Gibeau, 1993), constituyen parte del mecanismo de acción de diversos patógenos que atacan a la planta, actuando como factores de virulencia, y también en el proceso de maduración del fruto (Marín-Rodríguez et al., 2002; Uluisik and Seymour, 2020). Además, las  **$\beta$ -galactosidasas** ( $\beta$ -Gal, EC 3.2.1.23) son capaces de modificar simultáneamente hemicelulosa y pectina (Xie et al., 2017). Por otra parte, las **celulasas** (Cx, EC 3.2.1.4) son capaces de degradar la matriz de celulosa de los frutos (Bu et al., 2013) y las **xiloglucano endotransglicosidasa/hidrolasa** (XET, EC 2.4.1.207; XEH, EC 3.2.1.151) pueden romper las moléculas de xiloglucano, principales componentes de las hemicelulosas, que dan rigidez a la pared celular, ya que forman una red con las microfibrillas de celulosa (Zhai et al., 2021). En frutos, la actividad XET se ha descrito como responsable en el proceso de ablandamiento postcosecha que ocurre durante la maduración de los mismos (Han et al., 2015).

### 1.2.2. Alteraciones de la membrana celular

Debido al almacenamiento en frío se producen alteraciones en la estructura de la membrana celular que dan lugar a una disminución en la permeabilidad, estabilidad y fluidez de la misma (Fig.1.10), debido al aumento de rigidez que se produce cuando se modifica la fracción lipídica de la membrana por peroxidación lipídica, saturación de los ácidos grasos y degradación de fosfolípidos (Larsson et al., 1990; Liang et al., 2020).

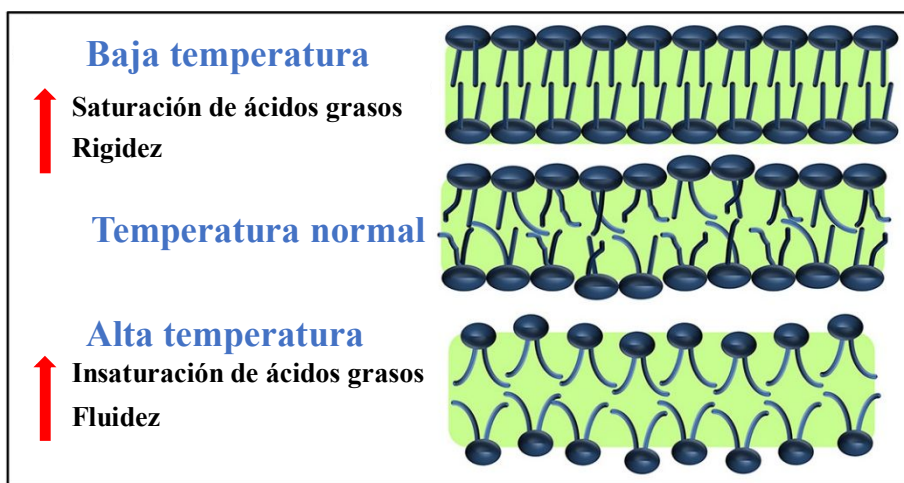


**Fig.1.10:** Representación de los cambios en la fluidez de membrana debidos al estrés por bajas temperaturas (Rawat et al., 2021).

En diversos estudios se ha probado que los organismos para defenderse de las bajas temperaturas aumentan la proporción de sus ácidos grasos insaturados, lo que incrementa la fluidez de membrana, ya que si aumenta la proporción de ácidos grasos saturados se dificulta la fluidez, lo que puede ocasionar roturas y la puesta en contacto de enzimas de degradación con sus sustratos, provocando pérdida de compuestos fenólicos y una debilitación en el sistema de defensa (Liu et al., 2015, 2022; X. Zhang et al., 2022). Por otra parte, esta degradación de las membranas incrementa la pérdida de electrolitos y el ablandamiento, haciendo al fruto más vulnerable frente al ataque de patógenos (Sevillano et al., 2009).

### **1.2.3. Estrés oxidativo**

Cuando los tejidos vegetales están expuestos a estreses, tanto bióticos como abióticos, se produce un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Apel and Hirt, 2004), entre ellos el estrés por frío produce un desequilibrio entre la producción y la detoxificación de ROS, dando lugar a estrés oxidativo en el tejido, lo que provoca la pérdida de calidad en el fruto (Valenzuela et al., 2017). Las principales especies reactivas del oxígeno son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). Éstas en condiciones normales se van produciendo en las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas de las células vegetales, sin suponer un problema debido a los diversos mecanismos de detoxificación que presenta la célula. Sin embargo, bajo condiciones de estrés se alteran los procesos de fotorrespiración, fotosíntesis y respiración mitocondrial, produciendo un rápido incremento en la producción de ROS. Además, estos estreses pueden deteriorar el sistema de detoxificación de ROS, lo que provocaría la peroxidación de lípidos de membrana con la degradación de la membrana celular, y daños tanto en el ADN como en el ARN, llevando a la muerte de la célula (Sevillano et al., 2009).

Por otra parte, las ROS cuando están a baja concentración pueden actuar como moléculas de señalización, beneficiosas para la célula, por lo que mantener el equilibrio de producción-detoxificación de ROS es clave para la célula, por ello la célula vegetal dispone de una amplia variedad de mecanismos que lo regulan (Mittler, 2002).

## **1.3. Mecanismos de defensa antioxidante**

La síntesis de proteínas capaces de actuar frente a las ROS es uno de los mecanismos más importantes en la defensa frente a estrés oxidativo, estos antioxidantes enzimáticos comprenden diversos grupos de proteínas que se asocian por la función que ejercen.

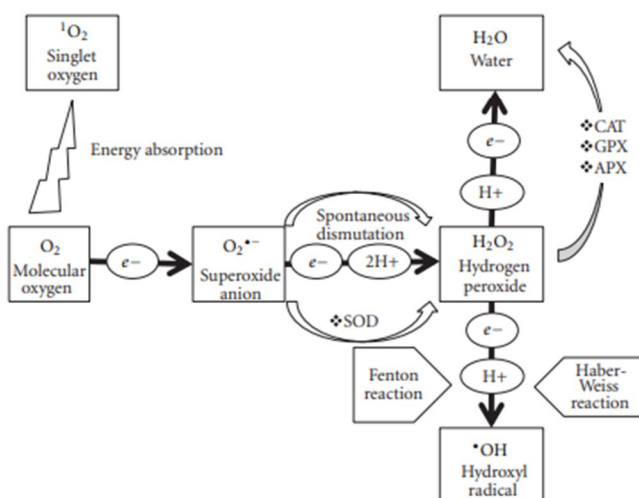


**Fig.1.11:** Representación esquemática de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Sharma et al., 2012).

Las **superóxido dismutasas** (SODs, EC 1.15.1.1) son metaloproteínas que actúan catalizando la reacción de dismutación del anión superóxido hacia peróxido de hidrógeno y oxígeno. Su elevada importancia deriva de que son la primera y única defensa frente al anión superóxido (Sharma et al., 2012). Dependiendo del metal con el que se encuentren ligadas existen 3 tipos de SODs, encontrándose cada uno en diferentes localizaciones: hierro (Fe-SOD) en cloroplastos, cobre y zinc (Cu/Zn-SOD) en cloroplastos y peroxisomas y manganeso (Mn-SOD) en mitocondrias y peroxisomas (Alscher et al., 2002). Una mayor actividad enzimática de este grupo se asocia generalmente a una mayor tolerancia frente a estreses ambientales (Gill et al., 2015), teniendo un papel fundamental en la supervivencia de plantas expuestas a estrés. Diversos tratamientos se han probado para incrementar la tolerancia al frío, en parte induciendo un incremento en esta actividad enzimática en frutos de tomate o calabacín (Castro-Cegri et al., 2023b; Shu et al., 2022).

La **enzima catalasa** (CAT, EC 1.11.1.6) es la encargada de descomponer las moléculas de peróxido de hidrógeno mediante una dismutación hacia una molécula de oxígeno y otra de agua. Reacción que se

lleva a cabo en los peroxisomas por las diferentes isoenzimas. Hay un elevado número de isoformas de CAT que se pueden agrupar en 3 grupos según su secuencia y estructura (Mhamdi et al., 2010). CAT1 es el grupo más extendido, con grupo hemo como cofactor, son monofuncionales y se encuentran principalmente en los tejidos fotosintéticos, CAT2 debido a que además del grupo hemo tienen una secuencia parecida a las peroxidases pueden actuar con ambas funciones, éstas generalmente se encuentran en los tejidos vasculares, y se agrupan como CAT3 aquellas que en vez de presentar grupo hemo contienen Mn como cofactor, se encuentran en semillas y órganos florales.

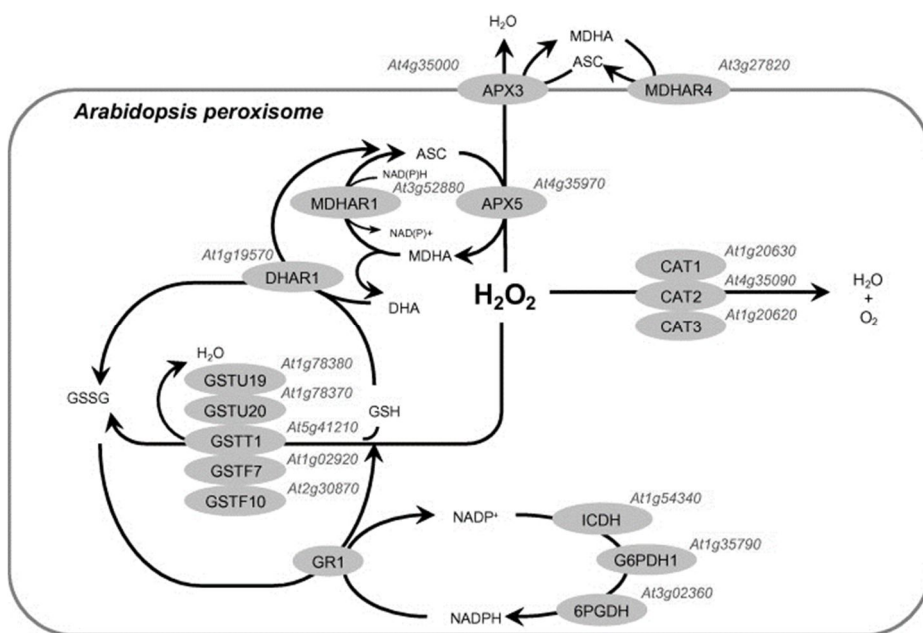


**Fig.1.12:** Esquema de las principales enzimas conocidas del peroxisoma con mayor involucración en el metabolismo del  $H_2O_2$  en plantas (Mhamdi et al., 2012).

Debido a la función que presenta, esta enzima se ha asociado con la inducción de la tolerancia al frío en diferentes frutos como mandarina (Sala and Lafuente, 2000), naranja (Habibi et al., 2022), banana (Chen et al., 2021) o calabacín (Carvajal et al., 2011).

Las **peroxidases** (POD, EC 1.11.1.7) comprenden un grupo amplio de enzimas capaces de reducir el peróxido de hidrógeno a agua, utilizando para tal

fin la oxidación de una amplia variedad de sustratos. Estas enzimas forman parte del ciclo ascorbato-glutatión o de Foyer-Halliwell-Asada, una de los principales mecanismos de detoxificación de ROS en plantas (Foyer and Halliwell, 1976; Halliwell and Foyer, 1976).

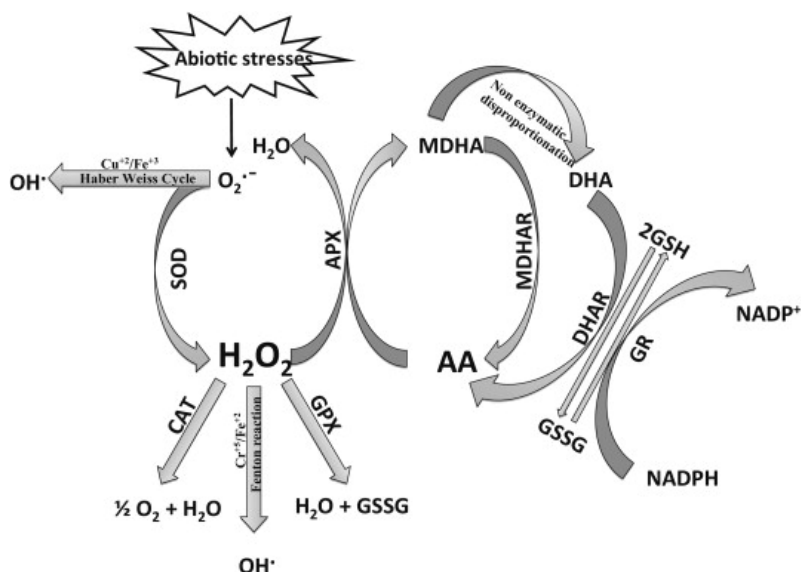


**Fig.1.13:** Esquema del ciclo ascorbato-glutatión (Gill and Tuteja, 2010).

Este ciclo se inicia cuando la enzima **ascorbato peroxidasa** (APX) reduce el peróxido de hidrógeno a agua oxidando una molécula de ascorbato (AA) y por ello formándose monodehidroascorbato (MDHA), que será reducido de nuevo hacia ascorbato por la acción de la enzima **monodehidroascorbato reductasa** (MDHAR), consumiendo a su vez poder reductor en forma de NAD(P)H. Aunque también de manera espontánea el MDHA puede producir AA y dehidroascorbato (DHA), este DHA puede ser reducido por la enzima **dehidroascorbato reductasa** (DHAR), oxidando en este caso glutatión (GSH) y formando glutatión oxidado (GSSG), que será reducido por la enzima **glutatión reductasa** (GR) utilizando NAD(P)H. Este ciclo ha sido estudiado ampliamente en la respuesta a estrés frío en frutos, concluyendo que diversos tratamientos que mejoran la tolerancia al frío, inducen las actividades enzimáticas de este ciclo (Habibi et al., 2019; Mahmoudi et al., 2022; Palma et al., 2014b; Shu et al., 2022)

Además de esta defensa antioxidante enzimática hay varios tipos de compuestos que comprenden los antioxidantes no enzimáticos, como el **ascorbato**, que es un compuesto que además de poder eliminar ROS interviniendo en la actividad enzimática ascorbato peroxidasa y el ciclo Foyer-Halliwell-Asada, es capaz de detoxificar ROS de manera directa, reduciéndolos y generando monodehidroascorbato (Smirnoff and Wheeler, 2000). El **glutati6n** (GSH) es un tripéptido que funciona como la mayor fuente no protéica de tioles en las células vegetales (Mahmood et al., 2010), la reactividad que presenta esta molécula junto con la cierta estabilidad y solubilidad que presenta en agua hacen al GSH un protector bioquímico ideal frente al estrés oxidativo en planta (Foyer and Noctor, 2005).

Además de estos dos compuestos, dentro del grupo de antioxidantes no enzimáticos encontramos los fenoles y los carotenoides. Los **compuestos fenólicos** abarcan un amplio grupo de compuestos del metabolismo secundario derivados de la ruta de fenilpropanoides, del siquimato y pentosas fosfato (Cheynier, 2012), que debido a su estructura presentan una elevada capacidad antioxidante. Hay identificadas más de 4000 estructuras fenólicas, con un anillo aromático y uno o más hidroxilos, abarcando desde simples ácidos fenólicos a compuestos altamente polimerizados como son los taninos (Balasundram et al., 2006). Se puede observar una inducción del metabolismo fenilpropanoide y acumulación de compuestos fenólicos como mecanismo de tolerancia frente a diversas condiciones de estrés (Albergaria et al., 2020; Król et al., 2014). La enzima **fenilalanina amonio liasa** (PAL; EC 4.3.1.5) produce la deaminación no oxidativa del aminoácido fenilalanina a ácido trans-cinámico y amonio libre. Es el primer paso y más importante en la ruta de biosíntesis de compuestos fenólicos derivados de la ruta de fenilpropanoides, como son flavonoides, isoflavonoides, cumarinas, ligninas y otros compuestos fenólicos (Jones, 1984). La expresión de esta enzima está regulada por diferentes estreses bióticos y abióticos, a nivel de regulación genética o mediante inactivación enzimática, fosforilación o activación/inhibición por productos de la ruta de

fenilpropanoides (Allwood et al., 1999; Jones, 1984; Sato et al., 1982). Por ello se han estudiado diferentes tratamientos que pudieran provocar tolerancia al frío debido a una inducción de esta actividad enzimática, como la aplicación de ácido salicílico y metil jasmónico en limón (Siboza et al., 2014), brasinoesteroides en tomate (Aghdam et al., 2012) o una aclimatación previa al almacenamiento en frío de pepino (Wang et al., 2021). La **polifenol oxidasa** (PPO; EC 1.14.18.1) es la principal enzima degradadora de compuestos fenólicos, es una enzima que posee cobre como centro catalítico, ésta cataliza dos reacciones diferentes en presencia de oxígeno molecular: la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles, y la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas, que pueden polimerizarse y dar lugar a pigmentos llamados melaninas (Solomon et al., 1996). Estas melaninas son las responsables del pardeamiento del fruto, uno de los principales problemas en la industria hortofrutícola, ya que produce alteraciones a nivel organoléptico y visual que afectan a la calidad del fruto, disminuyendo además el contenido en compuestos fenólicos (Tomás-Barberán and Espín, 2001). Para evitar el rápido incremento en la actividad PPO, que se produce como consecuencia de la degradación celular cuando el tejido está expuesto a estrés por frío, se han utilizado una amplia variedad de tratamientos como melatonina, glicina betaína o quitosano en combinación con sorbato de potasio (Habibi et al., 2022; Jannatizadeh, 2019; Molaei et al., 2021).

Los **carotenoides** son compuestos lipofílicos derivados de isoprenoides, son pigmentos fotosintéticos esenciales que pueden amortiguar un exceso en la radiación lumínica y eliminar el exceso de ROS generado durante el proceso fotosintético (TianHu et al., 2018), siendo además precursores de fitohormonas tan importantes como el ácido abscísico y las estrigolactonas (Al-Babili and Bouwmeester, 2015; Finkelstein, 2013).

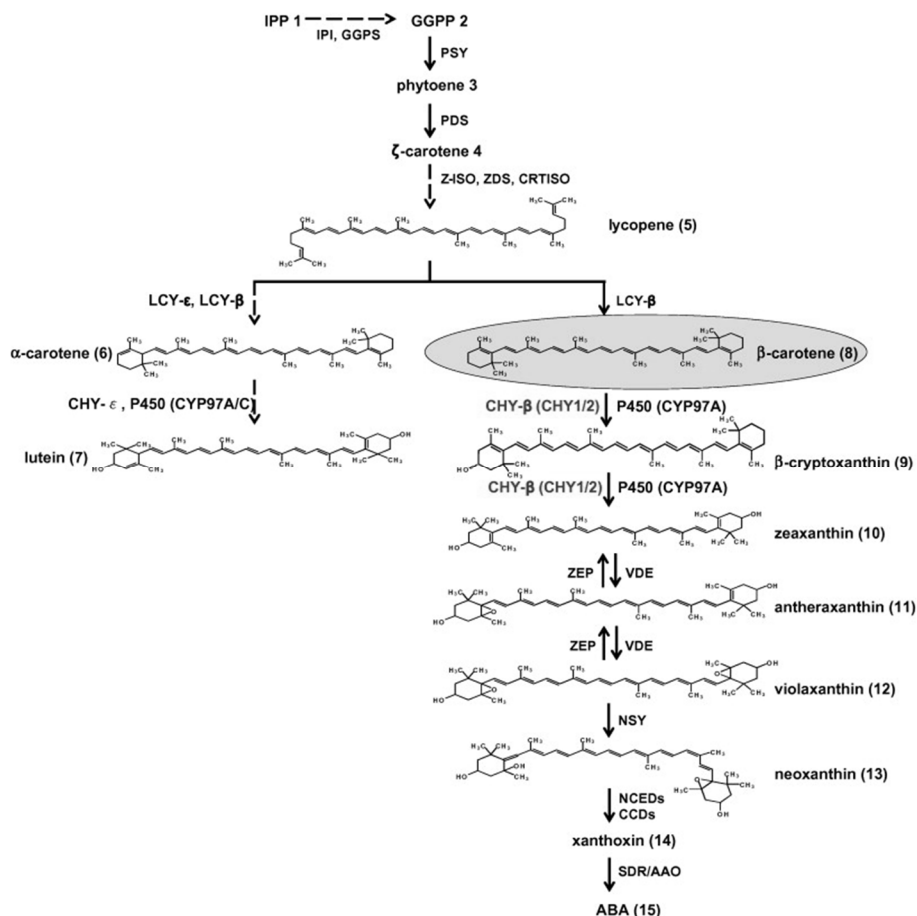


Fig.1.14: Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas (Kim et al., 2012).

## 1.4. Avances en la mejora de la calidad postcosecha

Debido a las elevadas pérdidas que se producen durante el periodo de transporte y comercialización, la investigación sobre la fisiología postcosecha conlleva una importante repercusión económica. Por ello, se está estudiando y desarrollando diferentes tecnologías para disminuir los daños durante este periodo de almacenamiento a baja temperatura, como son los **tratamientos físicos**, entre los que se incluyen el preacondicionamiento térmico con el objetivo de aclimatar los frutos y así proteger las membranas de la degradación que se produce en condiciones de estrés por frío (Carvajal et al., 2015b; Wang

et al., 1992), o el uso de atmósferas modificadas, que es uno de los tratamientos más utilizados y estudiados, mediante el uso de empaquetamientos y retractilados plásticos que reducen muy eficazmente el estrés oxidativo y la incidencia de daños por frío en el fruto (Megías et al., 2015; Wang and Qi, 1997). Sin embargo, el uso de plásticos para la generación de estas atmósferas modificadas provoca una elevada cantidad de residuos de difícil degradación y que se están incorporando al medio ambiente. Una alternativa a estos recubrimientos plásticos son las cubiertas naturales comestibles, compuestas a base de polisacáridos, lípidos y/o proteínas, aprovechando subproductos de la industria agroalimentaria, como almidón o dextrina de patata, o quitosano del exoesqueleto de crustáceos (Adhikary et al., 2022; Amariz et al., 2010; Francisco et al., 2020), además más recientemente se está estudiando la combinación de estos tipos de empaquetados con el uso de nanopartículas que incrementan la actividad de estos compuestos (Nasr et al., 2021; Shankar et al., 2021; D. Yang et al., 2023). Otra estrategia para mantener la calidad postcosecha sería la utilización de **tratamientos químicos** utilizando compuestos que actúan como elicitores de determinadas rutas metabólicas incrementando la tolerancia al frío, como el 1-MCP, que bloquea la acción del etileno y por ello retrasa la maduración, actuando tanto en frutos climatéricos como el melocotón (Qian et al., 2021), como en no climatéricos como el calabacín (Megías et al., 2016b). También para mantener la calidad postcosecha del fruto de calabacín durante su frigoconservación se ha descrito la aplicación de poliaminas o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Palma et al., 2014a, 2019a) que inducen la ruta GABA shunt permitiendo al fruto mantener mayores niveles de energía y poder reductor para defenderse en dicha situación de estrés. Mientras que la aplicación de óxido nítrico induce los mecanismos de defensa antioxidantes del fruto durante su almacenamiento en frío (Jiménez-Muñoz et al., 2021).

Sin embargo, una alternativa a la aplicación de tratamientos físicos o químicos es la utilización de programas de mejora genética para incrementar la tolerancia al frío del fruto de calabacín. Las técnicas biotecnológicas son ideales

para el desarrollo de nuevas variedades que sean más tolerantes a los diferentes estreses, mediante la inducción o represión de la expresión de determinados genes relacionados con el estrés por frío. Sin embargo, *Cucurbita pepo* es una de las especies más recalcitrantes para establecer protocolos que permitan llevar a cabo regeneración y transformación, lo que hace muy difícil establecer líneas de mejora mediante esta metodología. Por ello, una alternativa sería el aprovechamiento de la variabilidad natural existente en bancos de germoplasma, así como la utilización de la plataforma de mutantes TILLING, para generar nuevas variedades más tolerantes al frío. Esta metodología se puede implantar debido al gran avance en las nuevas tecnologías de secuenciación y tratamiento de datos, que nos permiten acceder a un fondo genético muy rico y poder identificar regiones que controlen determinados caracteres fenotípicos de interés.

## **2. OBJETIVOS**



El **objetivo principal** de esta Tesis Doctoral es el estudio de los mecanismos bioquímicos y genéticos que regulan la tolerancia al frío del fruto de calabacín (*Cucurbita pepo*), con el fin de desarrollar nuevos tratamientos e identificar regiones genómicas implicadas en el mantenimiento de la calidad y la vida útil del fruto durante su almacenamiento postcosecha en frío. Para ello se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

1. Selección y desarrollo de un recubrimiento natural comestible de tipo polisacarídico, aditivado con sustancias que aporten calidad y propiedades nutraceuticas al fruto.
2. Evaluación fisiológica y bioquímica del papel del ácido abscísico en la tolerancia al frío del fruto de calabacín.
3. Análisis de la implicación de la riboflavina en los mecanismos de defensa frente a los daños por frío durante la frigoconservación del fruto de *Cucurbita pepo*.
4. Estudio de asociación del genoma completo (GWAS) para identificar regiones cromosómicas y genes asociados a la tolerancia al frío del calabacín, que permitan diseñar marcadores útiles para programas de mejora vegetal.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3.1. Material vegetal y experimentos realizados**

#### ***3.1.1. Aplicación de recubrimientos comestibles a base de polisacáridos para mejorar la calidad del fruto de calabacín durante el almacenamiento en frío***

Frutos de calabacín (*C. pepo* L. morfotipo Zucchini) del híbrido comercial “Sinatra” (Clause–Tezier) fueron proporcionados por Fruits & Vegetables La ÑECA S.A.T. (Almería, España). El fruto de la variedad Sinatra se cosechó con un tamaño de unos 20 cm de largo y 5 cm de diámetro, un peso de entre 250 y 300 gramos, y en estado inmaduro. Se realizaron 2 experimentos:

**-Experimento 1:** Se usaron los polisacáridos dextrina, almidón, quitosano y carboximetilcelulosa para las formulaciones de recubrimiento. Para ello la solución de dextrina se preparó en agua a 65 °C bajo agitación mecánica durante 1 hora. El almidón de patata también se preparó en agua, pero a 90 °C y durante 2 horas de agitación mecánica. El quitosano se disolvió en una solución 0.7 % (p/v) de ácido acético en agua bajo agitación mecánica durante 2 horas, y posteriormente el pH fue neutralizado ajustándolo a 7 con 1M NaOH (Yan et al., 2019). La solución de carboximetilcelulosa se preparó en agua a 80 °C, bajo agitación mecánica durante 2 horas (Arnon et al., 2015).

Estos tratamientos se aplicaron sumergiendo el fruto durante 5 min a 20 °C en agua destilada como control (C), 1 % (p/v) dextrina (D), 1 % (p/v) de almidón (A), 1 % (p/v) quitosano (Q), y 1 % (p/v) de carboximetilcelulosa (CMC). Estos recubrimientos a base de polisacáridos se utilizaron con y sin glicerol al 1.5 % (v/v) para determinar el efecto de este agente plastificante. Las concentraciones que se utilizaron para cada polisacárido fueron elegidas de acuerdo a experimentos preliminares (datos no mostrados), y el porcentaje de plastificante según bibliografía (Lima et al., 2010; Thakur et al., 2019; Torabi et al., 2020). Tras realizar los diferentes tratamientos los frutos se secaron a temperatura ambiente durante 2 horas, previamente a ser transferidos a una cámara de condiciones controladas a 4 °C y 85-90 % humedad relativa (HR) en

oscuridad. Se realizaron tres réplicas biológicas por cada tratamiento y periodo de almacenamiento, cada una con 6 frutos diferentes. Los parámetros de pérdida de peso y daños por frío se determinaron tras 3, 7, 10 y 14 días de almacenamiento. A los 14 días se midió también la tasa de respiración y la firmeza. A los 0 y 14 días de almacenamiento a 4 °C, se aislaron los exocarpos de todos los frutos de la réplica, se mezclaron, congelaron y pulverizaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C para los posteriores análisis bioquímicos.

**-Experimento 2:** En este experimento se utilizó el recubrimiento polisacarídico de dextrina con diferentes aditivos, y su aplicación se realizó de la misma forma que en el experimento 1. En este caso, los frutos se sumergieron en 100% de agua como control (C), dextrina (D) 1 % (p/v), dextrina 1 % (p/v) con oleuropeína 0.3 % (p/v) (DO), y dextrina 1 % (p/v) con aceite de oliva virgen extra 0.2 % (v/v) (DA). La oleuropeína fue purificada de hojas de olivo en colaboración con el grupo FQM 208 (glicoquímica y conjugación) del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, y disuelta bajo agitación mecánica a temperatura ambiente, el aceite de oliva utilizado fue comercial, que se emulsionó con un homogeneizador Ultraturrax T25 a 13500 rpm durante 4 minutos en la correspondiente solución polisacarídica (Vargas et al., 2006). Una vez realizados los tratamientos, para la obtención del material se llevó a cabo el mismo procedimiento que el explicado en el experimento 1.

### ***3.1.2. Implicación de la hormona ácido abscísico en la tolerancia al frío del fruto de calabacín***

Los frutos de calabacín usados en los experimentos fueron de la variedad comercial “Sinatra” (Clause–Tezier) obtenidos en Fruits & Vegetables La ÑECA S.A.T. (Almería, España). Los frutos tenían un tamaño de unos 20 cm de largo y 5 cm de diámetro, un peso de entre 250 y 300 gramos, y se cosecharon en estado inmaduro. Se prepararon tres repeticiones por tratamiento y periodo de almacenamiento, cada una compuesta por 6 frutos de tamaño similar. Inmediatamente después de la cosecha se muestrearon 18 frutos para

estudiar sus características antes de la aplicación de los tratamientos (T0), y 108 frutos se agruparon en 2 lotes (tratamiento ABA y control). Los frutos se sumergieron a 20 °C durante 20 min en ABA 0.5 mM o en agua destilada como control, se secaron durante 2 h a temperatura ambiente y se almacenaron en cámara de ambiente controlado, en oscuridad permanente, a 4 °C y 85–90 % de HR, durante 1, 5 y 14 días. Transcurrido cada período de almacenamiento, se extrajeron los exocarpos de todos los frutos, se mezclaron, congelaron y se pulverizaron en nitrógeno líquido, una parte se almacenó a -80 °C y el resto se liofilizó.

### ***3.1.3. Efectos bioquímicos postcosecha de la aplicación exógena de riboflavina al fruto de calabacín durante su almacenamiento en frío***

Frutos de calabacín de la variedad comercial “Logos” (Syngenta) fueron proporcionados por Fruits & Vegetables La ÑECA S.A.T. (Almería, España). El fruto de calabacín se cosechó con un tamaño de unos 20 cm de largo y 5 cm de diámetro, un peso de entre 250 y 300 gramos, y en estado inmaduro. Se prepararon tres repeticiones por tratamiento y periodo de almacenamiento, cada una compuesta por 6 frutos de tamaño similar. Inmediatamente después de la cosecha se muestrearon 18 frutos para estudiar las características del fruto antes de la aplicación de los tratamientos (T0), y posteriormente se aplicaron de forma exógena mediante una inmersión de 20 min a 20 °C las dosis de 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 mM de riboflavina. Una vez realizada la inmersión, los frutos se secaron durante 2 h a temperatura ambiente y luego se almacenaron en cámara de ambiente controlado, en oscuridad permanente, a 4 °C y 85–90 % de HR, durante 1, 5 y 14 días. Transcurrido cada período de almacenamiento, se extrajo todo el exocarpo de cada fruto, se mezcló por réplica, se congeló y se pulverizó en nitrógeno líquido, una parte se almacenó a -80 °C y el resto se liofilizó.

### ***3.1.4. Identificación de QTLs asociados a mecanismos fisiológicos de tolerancia al frío en el fruto de calabacín***

Los parentales utilizados en este experimento fueron dos híbridos comerciales (F1) contrastantes para la tolerancia al frío del fruto de calabacín: “Natura” (N) (Enza Zaden) variedad tolerante al frío y “Sinatra” (S) (Clause-Tezier) variedad sensible al frío. Se realizó una primera plantación en la campaña de primavera 2019 con el objetivo de obtener semillas de autocruzamiento de Natura (NxN) y Sinatra (SxS), así como también semillas del cruce (NxS y SxN) obteniendo una población segregante. Una vez que se generaron estas semillas, se realizó la evaluación en dos campañas diferentes.

La primera plantación se llevó a cabo en la campaña de otoño (Septiembre-Noviembre) de 2019, con 18 plantas de Natura, 18 de Sinatra, 67 NxN, 67 SxS, y 134 plantas de cruce (NxS y SxN), en invernadero bajo condiciones ambientales locales en Almería, España. Frutos en estado comercial (sin deformaciones y con similar rango de tamaño) fueron cosechados de cada planta individualmente, y almacenados en una cámara de condiciones controladas, 4 °C y 85-90 % HR, durante 14 días para analizar la calidad postcosecha a través de pérdida de peso y daños por frío. En aquellas plantas que produjeron más de 5 frutos evaluables se les cosechó un set diferente de frutos para medirle ABA endógeno tras el almacenamiento de estos frutos a 4 °C durante 5 días, a estos frutos se les retiró el exocarpo, fue pulverizado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C.

Con el objetivo de revalidar los datos obtenidos en esta plantación, una segunda se realizó en la campaña de primavera (Marzo a Mayo) de 2021, donde se sembraron 18 plantas de Natura, 18 de Sinatra y 180 plantas del cruce (NxS y SxN). Se les cosechó frutos de la misma manera que en la anterior campaña y se les midió pérdida de peso y daños por frío tras 14 días de almacenamiento en frío.

A todas las plantas de ambas campañas se les tomó muestra de hoja joven, congelándola con nitrógeno líquido y almacenándola a -80 °C, con el objetivo de poder hacer extracción de ADN posteriormente.

## **3.2. Análisis fisiológico del fruto**

### ***3.2.1. Pérdida de peso***

El porcentaje de pérdida de peso de cada fruto se calculó mediante la fórmula: % pérdida de peso=  $(P_i - P_f)/P_f \times 100$ , siendo  $P_i$  el peso inicial de cada fruto y  $P_f$  el peso del mismo fruto tras cada periodo de almacenamiento en frío.

### ***3.2.2. Estimación del índice de daños por frío***

El índice de daños por frío se calculó mediante una escala visual basada en síntomas de superficie necrótica e intensidad de picado, descrito previamente por (Martínez-Téllez et al., 2002). Cada fruto fue evaluado mediante la siguiente escala: 0, sin daño; 1, daño ligero (10% o menos de la superficie afectada); 2, daño medio (10-20% de la superficie afectada); y 3, daño severo (>20% de la superficie afectada). El índice fue calculado a través de la siguiente fórmula:  $\sum (\text{valor de la escala (0-3)} \times \text{número de frutos de cada valor}) / \text{número de frutos evaluados}$ .

### ***3.2.3. Firmeza***

La firmeza de los frutos se midió con un penetrómetro especial para fruta (TR TURONI-Italy model 53,205) semiautomático penetrando 2 cm de profundidad una sonda cilíndrica de 8 mm de diámetro en dos zonas del fruto: zona media (1) y zona próxima al cierre pistilar (2) como se muestra en la figura 3.1. Los resultados fueron expresados en Newtons (N).

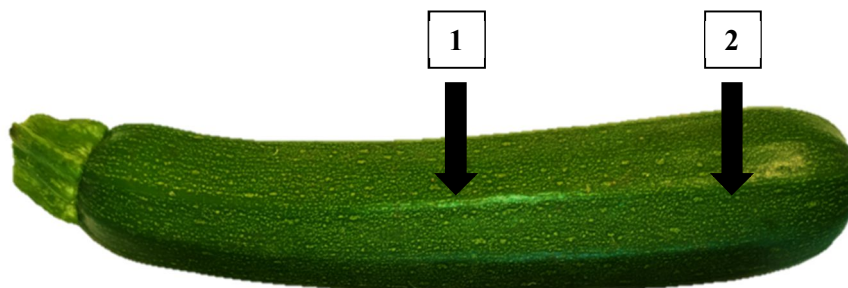


**Fig.3.1:** Zonas del fruto de calabacín en las que se realizaron las medidas de firmeza.

#### ***3.2.4. Pérdida de electrolitos en membrana***

El parámetro de pérdida de electrolitos en membrana se determinó en el exocarpo fresco de calabacín siguiendo el método propuesto por (Mao et al., 2007). Para cada réplica se extrajeron 10 taleolas de 11 mm de diámetro, con 1-1.5 mm de grosor, se lavaron con agua destilada durante 3 min y se agitaron a 200 rpm a temperatura ambiente en 50 mL de agua destilada durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se midió la conductividad del medio ( $EC_0$ ) con un conductímetro Consort C860 equipado con un electrodo Consort SK10T (Consort nv, Bélgica). Tras tomar esta medida se hirvieron las taleolas en su medio de incubación durante 10 min, y una vez enfriadas se midió de nuevo la conductividad del medio para obtener la conductividad máxima ( $EC_M$ ). La fórmula que se utilizó para calcular el porcentaje de pérdida de electrolitos fue la siguiente:  $(EC_0 \times 100) / EC_M$ .

#### ***3.2.5. Tasa respiratoria***

La tasa respiratoria se midió como producción de  $CO_2$ , para ello se introdujeron 2 frutos en un recipiente hermético de 4 L de capacidad, durante 4 horas a temperatura ambiente, y se midió el porcentaje de  $CO_2$  con el instrumento Dansensor Checkpoint 3. Para calcular cuánto  $CO_2$  se produjo se calculó la diferencia en porcentaje entre la medida inicial y la final, posteriormente teniendo en cuenta el volumen que queda de aire en cada uno de los recipientes se calculó el volumen de  $CO_2$ , y mediante la fórmula  $PV=nRT$

se calculó la cantidad en moles, esto nos sirvió para calcular la cantidad en mg, y tras tener en cuenta tanto el peso de los frutos como el tiempo de incubación, se expresó finalmente como  $\text{mg CO}_2 \text{ Kg}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ . Para cada tratamiento se realizaron tres réplicas de dos frutos cada una, y esos frutos fueron posteriormente descartados.

### **3.3. Determinaciones analíticas**

#### ***3.3.1. Peroxidación lipídica (TBARS)***

La peroxidación lipídica, determinada como contenido de malondialdehído (MDA), se realizó en el exocarpo del fruto calabacín siguiendo el método descrito por Heath and Packer (1968) con algunas modificaciones. El método se basa en la cuantificación de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del MDA, producto final de la peroxidación lipídica. La extracción se realizó homogeneizando 0.5 g de exocarpo fresco con 1 mL de TCA al 20 % (p/v) y 0.2 mL de BHT al 4 % (p/v). Dicho extracto fue centrifugado a  $10,000 \times g$  durante 15 min a 4 °C y se tomó el sobrenadante. La reacción se llevó a cabo con 250  $\mu\text{L}$  de sobrenadante al que se le añadió 750  $\mu\text{L}$  de TBA 0.5 % (p/v), se agitó y se incubaron en baño a 94 °C durante 30 minutos. Se paró la reacción en hielo durante 10 min, se volvieron a centrifugar las muestras a  $10,000 \times g$  durante 10 min a 4 °C y se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm de longitud de onda para la absorbancia del compuesto y a 600 nm para medir la absorbancia inespecífica. El contenido en TBARS se calculó mediante una curva de calibración de MDA y los resultados se expresaron en  $\mu\text{g MDA Kg}^{-1} \text{PF}$ .

#### ***3.3.2. Peróxido de hidrógeno***

El contenido en  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó según el método de Alexieva et al. (2001). Se homogeneizaron 0.5 g de material vegetal fresco con 1.5 mL de TCA al 0.1 % (p/v) y fue centrifugado a  $12,000 \times g$  durante 15 min a 4 °C. La reacción se realizó con 250  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, 250  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato potásico 100

mM pH 7 y 500  $\mu$ l de yoduro potásico 1 M. Se mezcló y se incubaron las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, posteriormente se midió la absorbancia de las muestras a 390 nm de longitud de onda. El contenido en  $H_2O_2$  se calculó mediante una curva de calibración del propio compuesto y se expresó como mg  $H_2O_2$  Kg<sup>-1</sup> PF.

### ***3.3.3. Test de capacidad antioxidante***

En el exocarpo del fruto de calabacín se realizaron 3 test de capacidad antioxidante.

**-ABTS:** El ensayo de capacidad antioxidante de Trolox (TEAC) se basa en la inhibición de la absorbancia del catión radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)) por parte de los compuestos antioxidantes que posee el extracto. Este ensayo se realizó siguiendo el método propuesto por Re et al. (1999) con modificaciones. Se homogeneizó 0.3 g de material vegetal fresco en 6 mL de acetona al 80 % con agua, se agitó durante 2 horas a 4 °C y posteriormente se centrifugaron los extractos durante 15 min a 5,000  $\times$  g a 4 °C. La reacción consistió en 100  $\mu$ l de sobrenadante diluido (2/3) con tampón acetato potásico 20 mM pH 4.5 y 900  $\mu$ l de reactivo ABTS 7mM preparado en el mismo tampón. Se incubó durante 1 hora y se midió la absorbancia de las muestras a 734 nm de longitud de onda. El porcentaje de inhibición de la formación del catión radical ABTS por los compuestos antioxidantes que contiene cada muestra se calculó mediante una curva de calibración del antioxidante sintético trolox. Los resultados se expresaron como mg trolox Kg<sup>-1</sup> PF.

**-DPPH:** La técnica para evaluar la capacidad antioxidante conocida como DPPH se basa en la utilización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) que reacciona con compuestos antioxidantes tomando un átomo de hidrógeno. Por lo que la capacidad antioxidante de la muestra está directamente relacionada con el % de inhibición del radical DPPH. Para medir este parámetro se maceraron 0.3 g de material vegetal fresco en 6 mL de acetona

al 80 %, se agitaron los extractos durante 2 horas a 4 °C y posteriormente se centrifugaron los extractos durante 15 min a  $5,000 \times g$  a 4 °C. La reacción se llevó a cabo con 100  $\mu$ l de sobrenadante diluido (1/4) en acetona 80 % y 900  $\mu$ l de reactivo DPPH (1 mg/ 70 mL metanol). Se agitaron e incubaron durante 1 hora en oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm de longitud de onda. Para calcular el % de inhibición del radical [DPPH\*] se utilizó la siguiente fórmula:  $[1-(\text{ABS muestra}-\text{ABSblanco}) / \text{ABScontrol}] \times 100$ . Donde los tubos control llevan metanol en vez de sobrenadante, y los tubos blanco llevan metanol en vez de reactivo de DPPH.

**-FRAP:** El método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) descrito por Benzie and Strain (1996) también se utilizó para medir la capacidad antioxidante de las muestras, éste se basa en su capacidad de reducir el hierro, y su reacción con el reactivo 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triacina (TPTZ). Para ello se realizó un extracto con 0.3 g de material vegetal fresco en 6 mL de acetona 80 %. Se agitaron durante 2 horas a 4 °C y se centrifugaron durante 15 min a 5,000 rpm a 4 °C. Posteriormente al sobrenadante diluido (1/2) con acetona 80 % (v/v), se le añadió 900  $\mu$ L de reactivo de FRAP (tampón acetato sódico 0.3 M pH 3.6 con TPTZ 10 mM y  $\text{FeCl}_3$  20 mM), se agitaron las muestras y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Finalmente se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm. La capacidad antioxidante medida por este método se calculó mediante una curva de calibración de  $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y los resultados se expresaron en  $\text{mg SO}_4\text{Fe Kg}^{-1}$  PF.

#### ***3.3.4. Fenoles libres totales***

El contenido en fenoles libres totales se midió en las muestras a través del método Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). Se realizó la extracción de 0.3 g de material vegetal fresco con 6 mL de acetona 80 % en agua. Se agitó durante 2 horas a 4 °C y se centrifugaron durante 15 min a  $5,000 \times g$  a 4 °C. Para llevar a cabo la reacción se tomaron 100  $\mu$ l de sobrenadante diluido (1/4) en acetona 80 % y se le añadió 250  $\mu$ l de Folin-ciocalteu diluido 1/5 en agua. Se incubaron 5 min en oscuridad y temperatura ambiente, y

posteriormente se le añadió 250 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 % (p/v) en agua y 900 µl de agua. Tras agitar las muestras se incubaron durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, se centrifugaron a 5,000 × g durante 5 min y se midió la absorbancia a 760 nm de longitud de onda. Para calcular el contenido en fenoles se realizó una curva de calibración con ácido gálico y se expresaron los datos como mg ácido gálico Kg<sup>-1</sup> PF.

### ***3.3.5. Fenoles solubles totales***

Para poder determinar el contenido de fenoles solubles totales (libres+glicosilados), se puso a punto un método en el que se realizó la extracción de estos compuestos a partir de 30 mg de material vegetal liofilizado con metanol 80 %. La mezcla se agitó en oscuridad durante 1 hora a 4 °C y se centrifugó a 5,000 × g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue hidrolizado con HCl 2M durante 1 hora a 96 °C en un vial sellado. Cuando las muestras estuvieron a temperatura ambiente se le añadió 0.3 mL de dietiléter, se les dio 30 segundos de vórtex y se centrifugaron a 5,000 × g durante 5 min y se tomó la fase superior para evaporarla bajo flujo de nitrógeno. Se resuspendió la muestra en 0.5 mL metanol 50 % y se determinó el contenido de fenoles siguiendo el método de Folin-Ciocalteu explicado en el apartado 3.3.4.

### ***3.3.6. Cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC***

Para la cuantificación de algunos compuestos fenólicos se llevó a cabo una extracción a partir de 50 mg de material vegetal liofilizado en metanol 80 %, se agitó en oscuridad permanente durante 1 hora a 4 °C y se centrifugaron las muestras a 5,000 × g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se evaporó bajo flujo de nitrógeno, y posteriormente se resuspendió la muestra en metanol 50 % y se inyectó en un UPLC (WATERS modelo ACQUITY I CLASS) equipado con una columna HSS T3 (1.8 µm, 2.1 mm × 50 mm), con un flujo de 0.4 mL min<sup>-1</sup> durante 12 minutos, usando un gradiente de elución compuesto por ácido acético 5 % (A) y acetonitrilo (B) como fases móviles. El gradiente utilizado fue el siguiente (min/%A): (0/95 %), (5/50 %), (5.1/0%), (10/0%), (10.1/95%). Un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (WATERS

modelo XEVO TQ-XS) en polaridad negativa, fue utilizado para cuantificar los compuestos fenólicos presentes en la muestra de acuerdo a sus respectivos patrones con las siguientes transiciones:

| Compuesto     | Transición 1 (m/z) | Cono (V) | Colisión (ev) | Transición 2 (m/z) | Cono (V) | Colisión (ev) |
|---------------|--------------------|----------|---------------|--------------------|----------|---------------|
| Vainílico     | 151.14 → 135.59    | 20       | 10            |                    |          |               |
| Elágico       | 301.10 → 144.59    | 12       | 36            | 301.10 → 228.86    | 12       | 26            |
| Ferúlico      | 192.96 → 133.51    | 2        | 16            | 192.96 → 177.64    | 2        | 12            |
| Cumárico      | 162.82 → 92.94     | 18       | 22            | 162.82 → 118.95    | 18       | 10            |
| Quercetina    | 301.07 → 150.63    | 44       | 20            | 301.07 → 178.67    | 44       | 14            |
| Isorhamnetina | 314.90 → 255.05    | 58       | 20            | 314.90 → 283.35    | 58       | 14            |
| Miricetina    | 316.75 → 162.89    | 20       | 10            | 316.75 → 190.92    | 20       | 10            |
| Naringenina   | 271.10 → 118.52    | 6        | 26            | 271.10 → 150.63    | 6        | 18            |
| Luteolina     | 285.08 → 132.52    | 30       | 32            | 285.08 → 150.63    | 30       | 24            |
| Rhoifolin     | 577.20 → 210.92    | 72       | 78            | 577.20 → 268.92    | 72       | 36            |
| Chrisoeriol   | 299.10 → 255.92    | 26       | 28            | 299.10 → 283.94    | 26       | 20            |

### 3.3.7. Flavonoides

Para medir el contenido en flavonoides se utilizó el método colorimétrico descrito por Chang et al., 2002, con algunas modificaciones. Se realizó una extracción con 30 mg de material vegetal liofilizado en etanol 80 %, se agitó en oscuridad permanente durante 1 hora a 4 °C y se centrifugaron las muestras a 10,000 × g durante 15 min a 4 °C. Posteriormente se llevó a cabo la reacción mezclando 100 µl de sobrenadante, con 100 µl de acetato de potasio 1M, 500 µl de cloruro de aluminio 10 % (p/v) y 300 µl de agua, esta mezcla se incubó durante 45 min a temperatura ambiente y oscuridad permanente.

Finalmente se midió la absorbancia en las muestras a 415 nm y el contenido en flavonoides se calculó mediante una curva de calibración de quercetina, expresando el resultado como mg quercetina Kg<sup>-1</sup> PS.

### **3.3.8. Ascorbato total**

Para medir el contenido en ascorbato se utilizó el método descrito por (Alós et al., 2013) con algunas modificaciones. 0.3 g de material vegetal fresco se homogeneizaron con 1.2 mL de ácido metafosfórico al 5 % en agua (v/v), se centrifugaron las muestras a 12,000 × g durante 15 min a 4 °C y se le añadió DTT hasta una concentración final de 5 mM. Se incubaron las muestras durante 1 hora a 4 °C y se filtraron con filtro de nylon de 0.22 micras.

Este compuesto se cuantificó por HPLC en un Agilent 1260 Infinity system equipado con una columna Agilent ZORBAX Eclipse plus C18 (150 mm x 4.6 mm id, 3.5 µm). Se utilizó un flujo de 0.4 mL min<sup>-1</sup> en condiciones isocráticas: 85 % agua Mili-Q pH 3 con acético y 15 % de metanol durante 7.5 min. La detección fue realizada mediante un diodo array a 254 nm. Los resultados se calcularon de acuerdo a una curva de calibración expresada como mg ascorbato Kg<sup>-1</sup> PF.

### **3.3.9. Carotenoides**

Para realizar la cuantificación de carotenoides (luteína, zeaxantina, alfa-caroteno y beta-caroteno) 100 mg de material vegetal liofilizado se homogeneizaron en 2 mL de hexano, conteniendo el estándar interno trans-β-APO-8'-carotenal (0.3 µg/mL), hidroxitolueno butilado (1 mg/mL) y 1.5 mL de solución hidróxido de potasio 1M en metanol. La mezcla fue agitada en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente los carotenoides fueron extraídos y saponificados con una solución saturada de cloruro de sodio. Dicha mezcla se centrifugó a 9,000 × g durante 5 min, y se tomó la fase superior no polar (hexano) que fue evaporada bajo flujo de nitrógeno. Finalmente, la muestra se resuspendió en 1 mL de isopropanol antes de ser inyectada en el HPLC.

Los carotenoides se analizaron por HPLC utilizando un 1260 Infinity Agilent system equipado con una columna YMC C30 (250x4.6 mm, 3  $\mu$ m), usando como fase móvil acetonitrilo/agua (95:5) (A) y metil tert-butil éter/acetonitrilo/agua (85:10:5) (B), con un flujo de 1.2 mL/min. El gradiente utilizado fue el siguiente (min/%A): (0/100%), (10/75%), (23/15%), (25/15%), (27/100%). Los carotenoides se detectaron utilizando un diodo array a 450 nm, y curva de calibración de sus respectivos estándares analíticos. Los resultados se expresaron como mg Kg<sup>-1</sup> PS.

### **3.3.10. Aminoácidos**

El estudio de aminogramas se realizó mediante una extracción de 0.3 g de material vegetal fresco en 1.5 mL de la mezcla etanol/cloroformo/HCl 0.1N (12/5/1; v/v/v) con 75  $\mu$ l de una mezcla de norvalina y sarcosina (500  $\mu$ g/mL) como estándar interno. Se centrifugaron las muestras a 8,000  $\times$  g durante 10 min a 4 °C y al sobrenadante se le añadió 0.5 mL de HCl 0.1N y 1 mL de cloroformo. Se agitaron las muestras y se centrifugaron a 5,000  $\times$  g durante 8 min a 4 °C, posteriormente se tomó la fase acuosa y se secó bajo corriente de nitrógeno. Tras ésto se resuspendieron las muestras en 1 mL de HCl 0.1N y se filtraron con filtro de nylon de 0.22  $\mu$ m, y se realizó una derivatización en pre-columna con o-ftalaldehído (OPA) y 9-fluoroenilmetil cloroformato (FMOC).

Para detectar este perfil de aminoácidos se analizaron las muestras por HPLC, Agilent 1260 infinity, con una columna Agilent Poroshell HPH-C18 (150x4.6 mm), y utilizando un detector de fluorescencia midiendo a 340 y 450 nm de longitud de onda para excitación y emisión respectivamente, desde el 0 min hasta 16 min, y a 260 y 325 nm de longitud de onda para excitación y emisión respectivamente, desde el 16 min hasta el 26 min. El flujo fue de 1.2 mL/min y la fase móvil se compuso de fosfato sódico 10 mM pH 7.8 (A) y acetonitrilo/metanol/agua (45/45/10; v/v/v) (B). El gradiente utilizado fue el siguiente (min/%A): (0; 80%), (20; 40%), (24; 40%), (26; 0%). Finalmente, los aminoácidos se identificaron y cuantificaron usando los tiempos de retención y

curva de calibración de sus respectivos estándares analíticos, expresando los resultados como  $\text{ng Kg}^{-1}$  PF.

### **3.3.11. Riboflavina, FMN y FAD**

Para determinar el contenido en riboflavina, mononucleótido de flavina (FMN) y dinucleótido de flavina-adenina (FAD) se realizó una extracción de 0.3 g de material vegetal fresco en 1.2 mL de etanol/cloroformo/agua (12/5/1; v/v/v). Estos extractos se centrifugaron a  $12,000 \times g$  durante 10 min a 4 °C, se tomó el sobrenadante y se le añadió 1 mL de cloroformo y 0.5 mL de agua. Se tomó la fase acuosa y se secó bajo flujo de nitrógeno. Posteriormente las muestras se resuspendieron en 0.6 mL de acetato de amonio 2.5 mM pH 6 y se filtraron con filtro de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Para el análisis cromatográfico riboflavina, FMN y FAD se analizaron por HPLC Agilent 1260 infinity equipado con una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (150x4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ). El flujo fue de 1 mL  $\text{min}^{-1}$  y el gradiente de elución se preparó con la fase móvil acetato de amonio 2.5 mM pH 6 (A) y acetonitrilo (B). El gradiente utilizado fue el siguiente (t (min); %A): (0; 90%), (1.5; 70%), (6.5; 70%), (7.5; 0%), (13; 0%) y (14; 90%). La detección se llevó a cabo mediante un detector de fluorescencia midiendo a 440 y 520 nm de longitud de onda para excitación y emisión respectivamente. La identificación y cuantificación se llevó a cabo usando los tiempos de retención y curva de calibración de sus respectivos estándares analíticos, expresando los resultados como  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  PF.

### **3.3.12. Ácido abscísico, trans-zeatina y trans-zeatina ribosido**

Para llevar a cabo la cuantificación de estas fitohormonas se realizó una extracción con 0.5 g de material vegetal fresco en 1 mL de la mezcla isopropanol/HCl 0.1N (10/5; v/v). Posteriormente, los extractos se agitaron durante 1 hora a 4 °C. Tras este proceso, las muestras se centrifugaron a  $12,000 \times g$  y 4 °C durante 10 min, se tomó el sobrenadante y se le añadió 0.5 mL de diclorometano. Tras una agitación vigorosa, las muestras se centrifugaron a

5,000 × g durante 7 min para separar las fases. Se tomó la fase orgánica (inferior) y se secó bajo flujo de nitrógeno. Para la detección de estos compuestos, las muestras secas, se resuspendieron en 0.2 mL de la mezcla acetonitrilo/ácido fórmico 0.1 % (1/1; v/v).

Para cuantificar estas fitohormonas se utilizó un UPLC (WATERS modelo ACQUITY I CLASS) equipado con una columna BEH C18 (1.7 µm, 2.1 mm × 50 mm), con un flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup>, usando un gradiente de elución compuesto por agua con fórmico al 0.1 % (A) y acetonitrilo con fórmico al 0.1 % (B) como fases móviles. El gradiente utilizado fue el siguiente (t (min); %A): (0; 90%), (6; 5%), (8; 5%), (8.1; 90%). Un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (WATERS modelo XEVO TQ-XS) en polaridad positiva, fue utilizado para cuantificar estos compuestos presentes en la muestra de acuerdo a sus respectivos patrones con las siguientes transiciones: *ácido abscísico*, *m/z* 263.10 → 153.00 y 204.03; *t-zeatin*, *m/z* 220.08 → 135.73 y 147.69; *t-zeatin ribósido* *m/z* 352.31 → 135.69 y 219.79.

### **3.3.13. Determinación de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó según el método descrito por Lowry et al. (1951). Los resultados se calcularon de acuerdo a una curva de calibración de albúmina de suero bovino.

## **3.4. Actividades enzimáticas**

### **3.4.1. Superóxido dismutasa**

La actividad superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Para determinar esta actividad enzimática utilizó el método de inhibición de la reducción fotoquímica de azul de nitrotetrazolio (NBT) propuesta por Beyer and Fridovich (1987). Se realizó la extracción con 0.3 g de material vegetal fresco, 0.1 g de polivinilpolipirrolidona y 1 mL de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8 conteniendo EDTA (0.1 mM) y mercaptoetanol (10 mM).

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a  $12,000 \times g$  durante 15 min a 4 °C y se llevó a cabo la reacción para la actividad enzimática.

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 azul de nitrotetrazolio (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. 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 durante todo el tiempo de reacción, 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 °C. Transcurrido este tiempo, se volvió a medir su absorbancia a 560 nm. Los resultados se expresaron como  $\text{U s}^{-1} \text{Kg}^{-1}\text{PF}$ , equivaliendo 1 U al 50% de inhibición de la fotooxidación del NBT.

### **3.4.2. Catalasa**

La actividad catalasa (EC 1.11.1.6) (CAT) que cataliza la destrucción del peróxido de hidrógeno se determinó en las muestras vegetales mediante el método descrito por Arbona et al. (2008) con modificaciones. Se llevó a cabo la extracción con 0.3 g de material vegetal fresco, 0.1 g de polivinilpolipirrolidona y 1 mL de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7 conteniendo EDTA (1 mM) y tritón X-100 (0.1 %; v/v). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a  $12,000 \times g$  durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para realizar la actividad enzimática.

La actividad catalasa se determinó cuantificando el consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$  remanente se realizó según se especifica en el apartado 3.3.2. La actividad se expresó en  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2 \text{s}^{-1} \text{Kg}^{-1}\text{PF}$ .

### **3.4.3. Ascorbato peroxidasa**

La actividad ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.1) cataliza la destrucción de peróxido de hidrógeno transformando el ascorbato en monodehidroascorbato. Esta actividad se determinó siguiendo el método propuesto por Hossain y Asada (1984) con algunas modificaciones descritas por Carvajal et al. (2015b). Se realizó la extracción con 0.3 g de material vegetal fresco, 0.1 g de polivinilpolipirrolidona y 1.6 mL de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8 conteniendo EDTA (0.1 mM), mercaptoetanol (10 mM) y ascorbato sódico (5 mM). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a  $15,000 \times g$  durante 20 min a 4 °C.

La reacción estaba formada por tampón Tris-HCl 0.05 M pH 7.8, L-ascorbato sódico 0.4 mM,  $H_2O_2$  0.3 mM y 0.05 mL de extracto en un volumen final de 1 mL. La disminución de absorbancia se midió a 290 nm durante 1 min a 25 °C. La actividad se calculó mediante el coeficiente de extinción molar de ascorbato  $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y los resultados se expresaron como mg ascorbato  $\text{s}^{-1} \text{ Kg}^{-1}\text{PF}$ .

### **3.4.4. Fenilalanina amonio liasa**

La actividad fenilalanina amonio liasa (PAL; EC 4.3.1.24) se midió según el método propuesto por Civello et al. (1997) con algunas modificaciones (Castro-Cegri et al., 2023c). 0.2 g de material vegetal fresco fueron homogeneizados con 1 mL de tampón fosfato sódico 0.1 M pH 8.8 conteniendo EDTA (2 mM),  $\beta$ -mercaptoetanol (10 mM), tritón X-100 (0.1 % v/v) y polivinilpolipirrolidona (5 % p/v). Los extractos se agitaron a 300 rpm y 4 °C durante 1 h, tras lo que fueron centrifugados 10 min a  $13,000 \times g$  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 extracto enzimático, en proporción (8:1:1; v/v/v). Después de una incubación a 37 °C durante 30 min la reacción se paró adicionando ácido tricloroacético (TCA) hasta una concentración final del 20 % (p/v). Las mezclas de reacción se centrifugaron 15 min a  $13,000 \times g$  antes de medir su absorbancia a 290 nm. Los resultados se expresaron como U

$\text{g}^{-1}$  proteína, donde 1 unidad equivale a un incremento de absorbancia de 0.001 por hora.

#### ***3.4.5. Polifenol oxidasa y peroxidasa***

Las actividades enzimáticas polifenol oxidasa (PPO; EC 1.14.18.1) y peroxidasa (POD; EC 1.11.1.7) se determinaron mediante el método propuesto por Castro-Cegri et al. (2023b). La extracción se realizó homogeneizando 1 g de material vegetal fresco en 3 mL de tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.8 y 0.1 g de polivinilpolipirrolidona. Los extractos se centrifugaron a  $15,000 \times g$  y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron saturando con sulfato amónico y centrifugaron durante 15 min a  $15,000 \times g$  y  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se resuspendió en 3 mL de tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.5 y se dializó 16 h a  $4^{\circ}\text{C}$  en el mismo tampón.

Para medir la actividad PPO 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 410 nm y los resultados se calcularon de acuerdo a una curva de calibración preparada con catecol y expresada como  $\mu\text{g catecol s}^{-1} \text{g}^{-1}\text{proteína}$ .

La reacción para la actividad POD se realizó en un 1 mL y consistió en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.8, 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 se registró durante 2 min a 470 nm. Los resultados se expresaron como  $\text{mg H}_2\text{O}_2 \text{s}^{-1} \text{g}^{-1}\text{proteína}$ .

### **3.5. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los parámetros fisiológicos, metabolitos y actividades enzimáticas cuantificadas se llevó a cabo mediante ANOVA utilizando el programa SPSS 26.0 (SPSS Inc.). Las medias se compararon mediante la prueba de diferencias mínimas significativas de Duncan ( $p < 0,05$ ).

### **3.6. Perfil de metabolitos primarios por GC-TOF-MS**

Los metabolitos primarios polares fueron extraídos y derivatizados siguiendo el método descrito por Lisec et al. (2006). Para realizar la extracción se utilizó 0.2 g de material vegetal fresco que se homogeneizó con 1440  $\mu$ L de metanol, y 60  $\mu$ L de ribitol 0.02 % (p/v) como estándar interno. Los extractos se incubaron a 70 °C durante 15 minutos, y se centrifugaron durante 10 min a  $14,000 \times g$ . Se tomó el sobrenadante y se les añadió 0.25 mL de cloroformo y 0.5 mL de agua mili-Q. Tras una agitación vigorosa, las muestras fueron centrifugadas a  $3,000 \times g$  durante 15 min y se tomó 0.15 mL de fase superior, llevándola a sequedad bajo flujo de nitrógeno. Para llevar a cabo la derivatización se añadieron 40  $\mu$ L de metoxiamina y se incubó 2 horas a 40 °C, y finalmente se añadieron 60  $\mu$ L de MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamina).

Los metabolitos primarios polares se midieron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tiempo de vuelo (GC-TOF-MS) como se describe en Osorio et al. (2012). Las cantidades de estos metabolitos se expresan como intensidad relativa, en función de la integración máxima y en relación con el ribitol. Los datos se normalizaron y escalaron para el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) utilizando MetaboAnalyst 5.0.

### **3.7. Análisis metabolómico no dirigido**

#### ***3.7.1. Análisis mediante UPLC-QTOF/ESI-MS (Cap.II)***

Para llevar a cabo un análisis metabólico no dirigido se realizaron los extractos con 0.5 g de material vegetal fresco en 3 mL de metanol/agua (80/20; v/v). Posteriormente, las muestras se agitaron durante 1 hora a 4 °C y se centrifugaron a  $10,000 \times g$  durante 15 min a 4 °C.

El sobrenadante se inyectó en un UPLC (WATERS modelo ACQUITY H CLASS) equipado con una columna BEH C18 (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  50 mm) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF) y sistema Triwave® (WATERS modelo SYNAP G2). Este espectrómetro de masas operó en ambos modos de ionización (positivo y negativo). El flujo de solvente fue de 0.3 mL min<sup>-1</sup> y un tiempo total de 22 min. El gradiente de elución se preparó con agua (A) y acetonitrilo (B). El gradiente utilizado fue el siguiente (t (min); %A): (0; 90%), (1.5; 90%), (16; 10%), (19.1; 10%).

Los datos en bruto se visualizaron y procesaron usando el programa MarkerLynxXS™ (Waters, Manchester, UK). Los parámetros utilizados fueron el tiempo de retención (1-20 min), el rango de masas (50-1200 Da), la ventana del tiempo de retención (0.01 min) y la tolerancia en la masa (0.008 Da). La detección de los picos y su alineamiento se procesaron usando el algoritmo ApexPeakTrack patentado por MarkerLynx. La normalización de los datos se realizó usando el total de las intensidades iónicas de cada pico, y para visualizar la matriz de correlación se realizó un gráfico S-plot siendo el nivel de significancia de  $r \geq 0.85$  según el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ). Para la elección de la estructura química correcta para cada pico seleccionado, se utilizó la masa exacta, los patrones de fragmentación, la composición elemental, el tiempo de retención y la búsqueda en las bases de datos (PlantCyc, MetaCyc, KEGG y ChemSpider). Finalmente, para realizar un mapeo de rutas, se utilizó la herramienta “Metabolomic Pathway Analysis” (MetPA), un componente de MetaboAnalyst 5.0.

### ***3.7.2. Análisis mediante UPLC-QTOF/ESI-MS (Cap.IV)***

El análisis se realizó siguiendo el método propuesto por (Rivera-Pérez et al., 2023), usando un sistema UPLC 1290, con una fuente de ionización de electrospray, acoplada a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF) (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA). 6  $\mu\text{L}$  de cada muestra se inyectaron en una columna Agilent® ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (2.1  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ), el flujo de solvente fue de 0.2 mL min<sup>-1</sup>, con un

gradiente de elución isocrático (6-94 % de eluyente B en 32 min), preparado con eluyente A (agua) y eluyente B (acetonitrilo), ambos conteniendo 0.1 % (v/v) de ácido fórmico. El espectrómetro de masas se operó en SCAN y modo de ionización positiva (ESI+), para MS y MS/MS. El procesamiento de los cromatogramas fue realizado en el MassHunter Qualitative Analysis software (versión B.06.00, Agilent Technologies).

Una vez se completó la anotación, los datos brutos adquiridos se procesaron por el programa MS-DIAL (v. 4.90). Se eligió la base de datos de FoodDB (<https://foodb.ca/>) para llevar a cabo la identificación de los compuestos, con márgenes de tolerancia de 0.01 Da y 0.05 Da para MS y MS/MS, respectivamente. Todos los compuestos que no fueron detectados en al menos el 83.33 % de las réplicas por grupo fueron eliminados, de acuerdo a Metabolomics Standards Initiative (MSI) (Salek et al., 2013).

Previamente a llevar a cabo todos los análisis estadísticos multivariantes se llevó a cabo un filtrado de los datos en Mass Profiler Professional 15.1 software (Agilent Technologies), “area threshold >10,000 counts”, transformación por Log2, y normalización de los datos al percentil 75. Posteriormente, se realizó un análisis de agrupamiento no supervisado (HCA) (Euclidean distance, Ward’s linkage method) para tener una visión general del agrupamiento de las muestras debido al tratamiento con riboflavina y al periodo de almacenamiento en frío. Los datos normalizados resultantes se analizaron mediante Pareto-scaling para análisis multivariante de los datos por SIMCA® version 17 software (Sartorius, Umeå, Sweden). Análisis supervisados “orthogonal projection to latent structures discriminant analysis” (OPLS-DA) se realizaron para cada día de almacenamiento en frío, comparando los frutos control con los tratados con riboflavina. Los parámetros goodness-of-fit ( $R^2Y$ ) y goodness-of-prediction ( $Q^2$ ) se consideraron para evaluar la calidad de los modelos, tomando un índice  $Q^2 > 0.5$  como límite para buena predictibilidad. El parámetro importancia variable en la proyección (VIP) se utilizó para identificar aquellos compuestos con mayor potencial de discriminación para

cada día de almacenamiento en frío, debido al tratamiento con riboflavina. Análisis de Fold change, expresados como Log<sub>2</sub>(FC), se llevaron a cabo por Mass Profiler Professional 15.1 software, con un valor de corte de FC > 2, entre frutos control y tratados con riboflavina.

### **3.8. Análisis de asociación de genes a fenotipo**

#### ***3.8.1. Contrucción de bulk de ADN***

Un total de 120 plantas del cruce (NxS y SxN) fueron fenotipadas, estudiando la pérdida de peso y los daños por frío de sus frutos a los 14 días de almacenamiento a 4 °C. Tras esta evaluación, se realizó un análisis de segregantes agrupados “bulk segregant analysis” (BSA), generando ADN a partir de dos grupos de 14 plantas para cada fenotipo contrastante, plantas productoras de frutos tolerantes al frío (T-bulk) y plantas productoras de frutos sensibles al frío (S-bulk). El ADN se extrajo de hojas jóvenes de ambos grupos de plantas, así como de 3 plantas del parental Natura (Natura-bulk) y 3 plantas del parental Sinatra (Sinatra-bulk). La extracción de ADN se llevó a cabo usando el kit de purificación de ADN GeneJET Genomic (Thermo Fisher Scientific), y se añadió la misma cantidad de ADN de cada planta a la hora de generar el bulk, para que la representatividad de todas las plantas fuese equitativa.

#### ***3.8.2. Secuenciación del genoma (WGS)***

El ADN genómico de cada bulk se cortó de forma aleatoria en fragmentos de aproximadamente 350 pb para la construcción de bibliotecas utilizando la tecnología de Illumina paired-end. La secuenciación fue llevada a cabo mediante Illumina Novaseq 6000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), que permitía generar lecturas de 150-bp paired-end. Se usaron diferentes pasos de control de calidad: 1) descartar las lecturas emparejadas cuando cualquiera de las lecturas contiene contaminación del adaptador; 2) descartar las lecturas emparejadas cuando los nucleótidos inciertos (N) constituyan más del 10 % de

cualquiera de las lecturas; 3) descartar las lecturas emparejadas cuando los nucleótidos de baja calidad (calidad de base inferior a 5,  $Q \leq 5$ ) constituyan más del 50 % de cualquiera de las lecturas.

Finalmente, los datos resultantes de secuenciación se alinearon con el genoma de referencia Cpepo\_v4.1 (<http://cucurbitgenomics.org/>) usando Burrows-Wheeler Aligner (BWA) con los parámetros predefinidos. Los duplicados fueron eliminados por SAMTOOLS (Li et al., 2009) y PICARD (<http://picard.sourceforge.net>). Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) se detectaron mediante el uso de GATK HaplotypeCaller.

### ***3.8.3. Análisis BSaseq***

El análisis BSA-seq se realizó utilizando el paquete de R “QTLseqr” (Mansfeld and Grumet, 2018). Los SNPs se filtraron utilizando la función “filterSNPs”, seleccionando así SNPs con: una frecuencia alélica de referencia entre 0,36 y 0,64; profundidad total entre 30 y 80; profundidad de lectura por muestra superior a 10; y calidad de genotipo superior a 99.

Siguiendo el método desarrollado por Takagi et al. (2013), la identificación de los QTL se basó en los parámetros SNP-index y  $\Delta$ (SNP-index), calculados mediante la función “runQTLseqAnalysis”. El SNP-index es la proporción de lecturas que albergan la variante que es diferente de la secuencia de referencia.  $\Delta$ (SNP-index) se calculó restando el SNP-index de S-bulk del T-bulk. Se calculó el promedio de SNP-index de SNPs ubicados en un intervalo genómico con un tamaño de ventana de 250 Kb, y entonces representado en una gráfica para generar las gráficas de SNP-index de todos los cromosomas analizados. Los intervalos de confianza del 95 % y el 99 % del  $\Delta$ (SNP-index) se calcularon bajo la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que no había QTL, utilizando un análisis de simulación de 10,000 repeticiones para cada bulk.

### ***3.8.4. Análisis genotípico de las regiones diana***

Los resultados del QTLseq se usaron para diseñar 6 marcadores SNP polimórficos, que fueron equidistantemente distribuidos en las regiones

genómicas identificadas, convirtiendo estos SNPs en KASP markers (Kompetitive Allele Specific PCR, [www.lgcgroup.com](http://www.lgcgroup.com)). 4 marcadores se utilizaron para genotipar la región diana localizada en el cromosoma 5, y 2 para la región localizada en el 18. Se tomó muestra de hojas jóvenes de cada planta individual, y el ADN fue extraído usando el método CTAB (Murray and Thompson, 1980), por lo que se genotiparon plantas segregando para la tolerancia al frío en sus frutos. Los primers necesarios se sintetizaron por LGC Genomics® (<http://www.lgcgroup.com>), y el ensayo KASP se realizó en FX96 FX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad®) usando el protocolo LGC (<https://afly.co/xyn2>). Las reacciones de PCR se realizaron con 10 µL de volumen de reacción final, en el que se contiene, 5 µL KASP V4.0 2× Master mix standard ROX (LCG Genomics®), 0.14 µL KASP-by-Design primer mix (LCG Genomics®), 2 µL de 5–50 ng/µL ADN genómico, y 2.86 µL de agua. Las condiciones del termociclado de la PCR fueron 15 min a 94 °C (activación con calor) seguido de 10 ciclos de 94 °C durante 20 s y 61 °C durante 1 min (cayendo -0.6 °C por ciclo para conseguir una temperatura de annealing de 55 °C) seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 20 s y 55 °C durante 1 min. Los datos se analizaron usando CFX Maestro™ Software (Bio-Rad®), para identificar los diferentes genotipos.

### ***3.8.5. Anotación de las variantes***

Los SNPs de los posibles QTLs identificados se extrajeron del archivo variant calling file (VCF) para análisis posteriores. La anotación funcional de las regiones cromosómicas identificadas fue obtenida para inferir los posibles efectos de los SNPs identificados usando el software SnpEff (Cingolani, 2022). La anotación del genoma de *Cucurbita pepo* está disponible en <http://cucurbitgenomics.org/>.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **Capítulo I. Aplicación de recubrimientos comestibles a base de polisacáridos para mejorar la calidad del fruto de calabacín durante el almacenamiento en frío**

*Castro-Cegri, A., Ortega-Muñoz, M., Sierra, S., Carvajal, F., Santoyo-Gonzalez, F., Garrido, D., Palma, F. (2023). Application of polysaccharide-based edible coatings to improve the quality of zucchini fruit during postharvest cold storage.*

*Scientia horticulturae. 314, 111941.*



## **I.1 Introducción**

En fruto de calabacín se han investigado una amplia variedad de tratamientos físicos para retrasar la aparición de los daños por frío y la pérdida de peso durante su almacenamiento a baja temperatura, entre otros destacan el pre-acondicionamiento térmico durante 48 horas a 15 °C (Carvajal et al., 2015), el uso de cámaras de atmósfera controlada con bajo nivel de oxígeno (Wang and Ji, 1989) o alto nivel de humedad (Zuo et al., 2021). Sin embargo, el tratamiento más efectivo para evitar la pérdida de peso y los daños por frío ha sido el uso de retráctilado plástico (Megías et al., 2015). El uso de recubrimientos plásticos, como un método para la preservación de los alimentos, está ampliamente extendido por Europa para la comercialización de diferentes frutos que se cosechan inmaduros, como son el pepino o el calabacín, pero su principal desventaja es la generación de residuos plásticos no biodegradables (Y. Chen et al., 2021). Debido al problema medioambiental que generan los residuos plásticos, el estudio de nuevos métodos respetuosos con el medio ambiente que sean de bajo coste, fáciles de incorporar en la cadena de producción y que sean efectivos es de vital importancia en la industria agroalimentaria.

La aplicación de recubrimientos naturales comestibles es una tecnología alternativa al plastificado que ha sido ampliamente estudiada en estos últimos años, con el objetivo de reducir la pérdida de calidad postcosecha del fruto durante su periodo de almacenamiento en frío. Estas cubiertas comestibles pueden estar formuladas en base a proteínas, lípidos o polisacáridos, solos o en combinación con otros metabolitos con función específica como aceites esenciales o compuestos fenólicos. Los polisacáridos son los compuestos más ampliamente empleados para la formulación de este tipo de cubiertas, siendo almidón, quitosano, celulosa y pectina los más utilizados, así como sus derivados, como pululano, carboximetilcelulosa o alginatos (Duong et al., 2022; Etemadipoor et al., 2020; Hassan et al., 2018; Shiekh et al., 2022). Estos polisacáridos actúan como una barrera selectiva

frente a gases y solutos preservando la calidad postcosecha del fruto; además, pueden ser ingeridos con seguridad por parte de los consumidores, y en algunas ocasiones, pueden mejorar la calidad organoléptica y nutricional de los productos (Baldwin et al., 1995; Thakur et al., 2019).

El almidón es un polisacárido compuesto de amilosa y amilopectina que ha sido ampliamente usado para producir cubiertas comestibles debido a su bajo coste y biodegradabilidad (Gutiérrez et al., 2015; Schwach and Avérous, 2004). Los recubrimientos basados en almidón disminuyen la pérdida de calidad del fruto durante el almacenamiento en frío (García et al., 1998; Thakur et al., 2019). La carboximetilcelulosa es un derivado de la celulosa, que se ha utilizado debido a su nula toxicidad, alta biodegradabilidad y buenas propiedades en la formación de cubiertas (Yan et al., 2019). La aplicación de cubiertas basadas en carboximetilcelulosa ha sido descrita como un tratamiento efectivo para preservar la calidad postcosecha en frutos como pera (Hussain et al., 2010), mandarina (Ali et al., 2021) o granada sometidos a estrés por frío (Nazoori et al., 2023). Quitosano es un polisacárido lineal derivado de la deacetilación de la quitina que es utilizado para prolongar la vida útil del fruto reduciendo el ablandamiento y los daños por frío (Mahmoudi et al., 2022; Zhang et al., 2015; Q. Zhang et al., 2022), con propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Aider, 2010; Lu et al., 2014). Dextrina es un polisacárido natural que se obtiene usualmente del almidón de la patata mediante rotura de los enlaces de forma física o químicamente (Andersson et al., 2002). El uso de dextrina está muy extendido como aditivo alimentario por su bajo coste, sin embargo, muy pocos estudios han analizado su potencial como recubrimiento comestible para frutos (Amariz et al., 2010; Ribeiro et al., 2009).

Para aumentar la funcionabilidad de estas cubiertas polisacarídicas, diferentes aditivos, como agentes antioxidantes, nutraceuticos, antimicrobianos o plastificantes, pueden ser incorporados a la matriz (Jiang et al., 2012; Mannozi et al., 2018; Özdemir and Gökmen, 2017). El glicerol es un agente plastificante ampliamente usado en la formulación de cubiertas, debido a su

capacidad para mejorar las propiedades mecánicas de los biopolímeros. Su presencia da lugar a cambios en la estructura de la película debido a la formación de nuevos enlaces (Cerqueira et al., 2012). Sin embargo, el glicerol es muy hidrofílico e higroscópico, por lo que puede afectar a la permeabilidad de los gases y vapor de agua a través de la cubierta (Sothornvit and Krochta, 2001).

Una de las principales limitaciones de las cubiertas basadas en polisacáridos es que constituyen una pobre barrera frente a la pérdida de agua, por el contrario, las lipídicas proveen una barrera efectiva frente al agua debido a su naturaleza hidrofóbica (Debeaufort and Voilley, 2009). Sin embargo, los lípidos tienen una baja integridad mecánica, por lo que formulaciones compuestas de polisacáridos y lípidos están siendo probadas en fruto. Un buen candidato para formular recubrimientos compuestos con polisacáridos es el aceite de oliva, debido a sus atributos bioquímicos y a su extensivo cultivo en la zona mediterránea (Ramana Rao et al., 2016). La producción de aceite de oliva también genera diferentes subproductos, como la hoja de olivo, que se puede utilizar como fuente de compuestos bioactivos (Berbel and Posadillo, 2018). De entre ellos, la oleuropeína es el componente fenólico mayoritario en el extracto de hoja de olivo (Jemai et al., 2008). Este metabolito ha sido ampliamente utilizado debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, cardioprotectoras, antihipertensivas y antiinflamatorias (Şahin and Bilgin, 2018). La suplementación de una cubierta comestible polisacarídica con este tipo de compuestos mantendría la calidad postcosecha del fruto durante su almacenamiento, y además podría aportar un valor añadido al fruto incrementando sus propiedades nutracéuticas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue, en primer lugar, evaluar el efecto de diferentes recubrimientos comestibles a base de polisacáridos, en el mantenimiento de la calidad del fruto de calabacín durante el almacenamiento en frío y, posteriormente, en el polisacárido seleccionado estudiar la influencia de dos

aditivos naturales obtenidos del olivo en la postcosecha y la calidad nutricional del fruto de calabacín.

## I.2 Resultados

### *I.2.1. Selección de una cubierta polisacáridica para mantener la calidad del fruto de calabacín*

Debido a la amplia diversidad de cubiertas polisacáridicas utilizadas en frutos, se realizó un experimento para seleccionar la formulación que mejor funcionara frente al estrés por frío en el fruto de calabacín. Para ello los frutos recién cosechados se trataron con agua (control), 1% (p/v) dextrina (D), 1% (p/v) almidón (A), 1% (p/v) quitosano (Q) y 1% (p/v) carboximetilcelulosa (CMC), probando además todos ellos con y sin 1.5% (v/v) de glicerol, y posteriormente fueron almacenados durante 14 días a 4 °C. Se evaluó el porcentaje de pérdida de peso e índice de daños por frío durante este periodo, resultados que se muestran en la tabla I.1. A 14 días de almacenamiento todos los recubrimientos mostraron una reducción de la pérdida de peso comparados frente al control, sin embargo, con el uso del plastificante no se observó dicho efecto, ya que no existen diferencias significativas con respecto al control. De entre todas las cubiertas polisacáridicas utilizadas, la dextrina fue la única que disminuyó significativamente los daños por frío al final del almacenamiento. Por otra parte, las cubiertas de quitosano y carboximetilcelulosa redujeron la tasa de respiración respecto al control tras el almacenamiento en frío (Tabla I.2). A pesar de que la tasa de respiración se midió tras la aclimatación del fruto a temperatura ambiente, el almacenamiento en frío disminuyó la producción de CO<sub>2</sub> en todos los tratamientos respecto a los frutos recién cosechados. En relación a esta respuesta, los frutos con el recubrimiento de dextrina, que presentaron menor índice de daños por frío, mostraron una tasa respiratoria más elevada que los frutos control después del almacenamiento en frío. Los frutos en los que se aplicaron las cubiertas en base a dextrina y CMC mostraron mayores índices de firmeza que los controles tras 14 días de almacenamiento (Tabla I.2), pero sólo la cubierta con dextrina fue capaz de mantener unos valores de firmeza iguales a los recién cosechados, lo que es de una gran importancia para la apreciación del fruto por parte del consumidor.

**Tabla I.1.** Cambios en el porcentaje de pérdida de peso e índice de daños por frío en fruto de calabacín control (C), recubierto con 1% dextrina (D), 1% dextrina con 1.5% glicerol (D+G), 1% almidón (A), 1% almidón con 1.5% glicerol (A+G), 1% quitosano (Q), 1% quitosano con 1.5% glicerol (Q+G), 1% carboximetilcelulosa (CMC) y 1% carboximetilcelulosa con 1.5% glicerol (CMC+G) durante el periodo almacenamiento a 4 °C.

|                                | Días a 4°C | C                  | D                   | D+G                 | A                   | A+G                 | Q                   | Q+G                 | CMC                | CMC+G               | LSD (p<0.05) |
|--------------------------------|------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------|
| Pérdida de peso (%)            | 3          | 5.67 <sup>a</sup>  | 4.68 <sup>bcd</sup> | 5.06 <sup>abc</sup> | 4.07 <sup>d</sup>   | 5.40 <sup>ab</sup>  | 4.55 <sup>bcd</sup> | 5.08 <sup>abc</sup> | 4.37 <sup>cd</sup> | 4.46 <sup>bcd</sup> | 0.66         |
|                                | 7          | 7.91 <sup>a</sup>  | 6.39 <sup>bc</sup>  | 7.17 <sup>ab</sup>  | 5.80 <sup>c</sup>   | 7.29 <sup>ab</sup>  | 6.06 <sup>bc</sup>  | 6.75 <sup>abc</sup> | 6.50 <sup>bc</sup> | 6.56 <sup>bc</sup>  | 0.86         |
|                                | 10         | 10.40 <sup>a</sup> | 8.33 <sup>b</sup>   | 9.54 <sup>ab</sup>  | 8.10 <sup>b</sup>   | 9.16 <sup>ab</sup>  | 8.31 <sup>b</sup>   | 9.18 <sup>ab</sup>  | 8.66 <sup>b</sup>  | 9.36 <sup>ab</sup>  | 1.12         |
|                                | 14         | 11.75 <sup>a</sup> | 9.45 <sup>b</sup>   | 10.77 <sup>ab</sup> | 9.26 <sup>b</sup>   | 10.55 <sup>ab</sup> | 9.50 <sup>b</sup>   | 10.51 <sup>ab</sup> | 10.05 <sup>b</sup> | 10.56 <sup>ab</sup> | 1.17         |
| Índice de daños por frío (0-3) | 3          | 0.77 <sup>a</sup>  | 0.30 <sup>ab</sup>  | 0.25 <sup>b</sup>   | 0.31 <sup>ab</sup>  | 0.67 <sup>ab</sup>  | 0.33 <sup>ab</sup>  | 0.5 <sup>ab</sup>   | 0.75 <sup>a</sup>  | 0.42 <sup>ab</sup>  | 0.31         |
|                                | 7          | 1.41 <sup>a</sup>  | 0.50 <sup>b</sup>   | 0.67 <sup>b</sup>   | 1.15 <sup>ab</sup>  | 1.00 <sup>ab</sup>  | 0.75 <sup>b</sup>   | 0.58 <sup>a</sup>   | 1.50 <sup>a</sup>  | 1.42 <sup>a</sup>   | 0.44         |
|                                | 10         | 2.14 <sup>ab</sup> | 1.00 <sup>c</sup>   | 1.25 <sup>c</sup>   | 1.69 <sup>abc</sup> | 1.75 <sup>abc</sup> | 1.50 <sup>bc</sup>  | 1.25 <sup>c</sup>   | 2.25 <sup>ab</sup> | 2.33 <sup>a</sup>   | 0.53         |
|                                | 14         | 2.41 <sup>a</sup>  | 1.00 <sup>b</sup>   | 1.58 <sup>ab</sup>  | 2.00 <sup>a</sup>   | 2.00 <sup>a</sup>   | 2.17 <sup>a</sup>   | 1.82 <sup>a</sup>   | 2.33 <sup>a</sup>  | 2.58 <sup>a</sup>   | 0.55         |

Los datos mostrados son medias de 18 frutos. Se han utilizado diferentes letras en cada periodo de almacenamiento para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

**Tabla I.2.** Tasa de respiración ( $\text{mg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ Kg}^{-1} \text{ PF}$ ), firmeza (N) y peroxidación lipídica ( $\mu\text{g MDA Kg}^{-1} \text{ PF}$ ) en fruto de calabacín, recién cosechado o almacenado a  $4^\circ\text{C}$  durante 14 días con los siguientes recubrimientos: control (C), recubierto con 1% dextrina (D), 1% dextrina con 1.5% glicerol (D+G), 1% almidón (A), 1% almidón con 1.5% glicerol (A+G), 1% quitosano (Q), 1% quitosano con 1.5% glicerol (Q+G), 1% carboximetilcelulosa (CMC) y 1% carboximetilcelulosa con 1.5% glicerol (CMC+G).

|                              | Recién cosechados  | C                  | D                  | D+G                 | A                  | A+G                | Q                  | Q+G                | CMC                | CMC+G              | LSD ( $p<0.05$ ) |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| <b>Tasa de respiración</b>   | 82.73 <sup>a</sup> | 68.82 <sup>c</sup> | 75.03 <sup>b</sup> | 70.92 <sup>bc</sup> | 68.81 <sup>c</sup> | 67.43 <sup>c</sup> | 60.44 <sup>d</sup> | 61.54 <sup>d</sup> | 55.31 <sup>e</sup> | 51.11 <sup>f</sup> | 4.07             |
| <b>Firmeza</b>               | 9.35 <sup>a</sup>  | 4.67 <sup>d</sup>  | 8.68 <sup>a</sup>  | 6.53 <sup>c</sup>   | 5.80 <sup>cd</sup> | 5.12 <sup>d</sup>  | 5.62 <sup>cd</sup> | 7.62 <sup>b</sup>  | 6.32 <sup>c</sup>  | 5.65 <sup>cd</sup> | 0.70             |
| <b>Peroxidación lipídica</b> | 324 <sup>c</sup>   | 578 <sup>ab</sup>  | 408 <sup>c</sup>   | 653 <sup>a</sup>    | 403 <sup>c</sup>   | 632 <sup>a</sup>   | 434 <sup>bc</sup>  | 670 <sup>a</sup>   | 437 <sup>bc</sup>  | 580 <sup>ab</sup>  | 61.31            |

Los datos presentados son medias de tres réplicas biológicas, de seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras en cada periodo de almacenamiento para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

Además, nuestros resultados muestran que, para el recubrimiento de dextrina, la peroxidación lipídica fue un 30% inferior que en los frutos control tras el periodo de almacenamiento en frío, observándose valores iguales a los de los frutos recién cosechados (Tabla I.2).

En función de todos estos parámetros estudiados, el recubrimiento natural de dextrina fue seleccionado como el más idóneo para mantener la calidad postcosecha del fruto de calabacín durante su almacenamiento a baja temperatura. Además, es el más respetuoso con el medio ambiente a la hora de incorporarse en la industria, ya que requiere menos energía en su proceso de elaboración.

### ***I.2.2. Influencia de aditivos en la cubierta de dextrina para la tolerancia al frío del fruto de calabacín***

En este estudio, el recubrimiento comestible con dextrina fue suplementado con aceite de oliva y oleuropeína, con la finalidad de usar estos aditivos para mejorar las propiedades de la cubierta. Los tratamientos consistieron en agua (control), 1% (p/v) dextrina (D), 1% (p/v) dextrina con 0.3% (p/v) oleuropeína (DO) y 1% (p/v) dextrina con 0.2% (v/v) aceite de oliva virgen extra (DA). En la figura I.1. se observa que el fruto de calabacín recubierto con dextrina perdió menos peso que los frutos control tras 14 días de almacenamiento, reduciéndose aún más con el uso de ambos aditivos. Los frutos control mostraron un alto índice de daños por frío, mientras que aquellos tratados con los recubrimientos mostraron una reducción significativa de este desorden fisiológico (Fig.I.1), siendo el tratamiento con aceite el que mejor funcionó en este aspecto, mostrando la mitad de daños que los frutos tratados con las otras cubiertas, y reduciendo alrededor de un 75% el índice de daños comparado con los frutos control tras el almacenamiento en frío. Esta mejora, tanto en pérdida de peso como en daños por frío, ocasionó que la apariencia visual de los frutos con todos los recubrimientos comestibles fuese notablemente mejor (Fig.I.2), especialmente los tratados con dextrina y aceite.

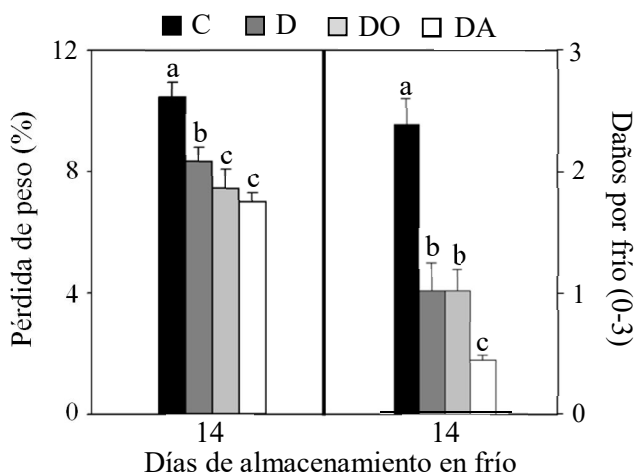


**Fig.I.1.** Cambios en porcentaje de pérdida de peso y daños por frío en frutos control (C), y tratados con dextrina (D), dextrina con oleuropeína (DO) y dextrina con aceite (DA). Los datos mostrados son medias  $\pm$  ES de 18 frutos. Se han utilizado diferentes letras para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

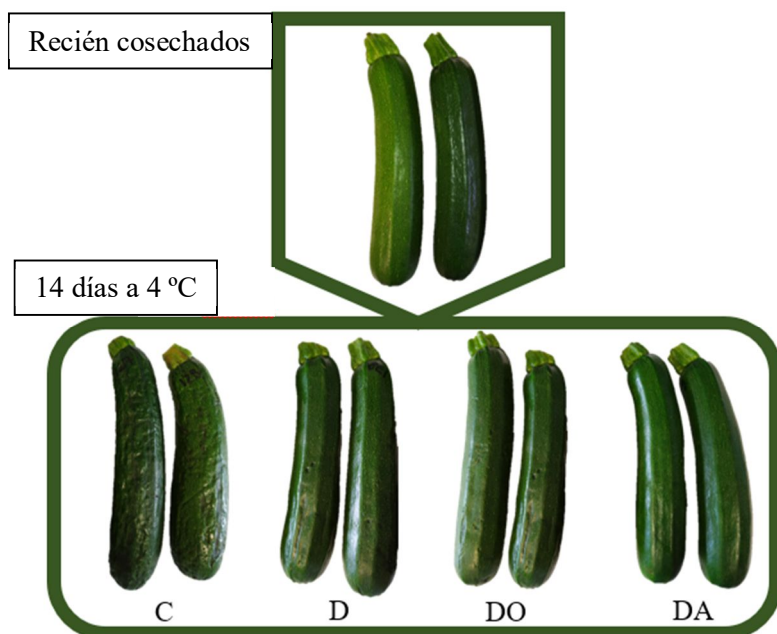


**Fig.I.2.** Cambio de apariencia entre los frutos recién cosechados, y tras 14 días de almacenamiento en frío en frutos control (C), y tratados con dextrina (D), dextrina con oleuropeína (DO) y dextrina con aceite (DA).

### ***I.2.3. Marcadores de estrés oxidativo***

En la figura I.3 se muestran los niveles de  $H_2O_2$  medidos en el exocarpo de frutos recién cosechados y tras el almacenamiento en frío. En todos los casos hubo un incremento del contenido en peróxido de hidrógeno debido al estrés por frío, sin embargo, el uso de dextrina, con o sin aditivos, fue efectivo para la reducción del contenido de  $H_2O_2$ , mostrando un 30% menos que los frutos control, lo que indica un fuerte incremento en los mecanismos antioxidantes inducidos por estos recubrimientos.

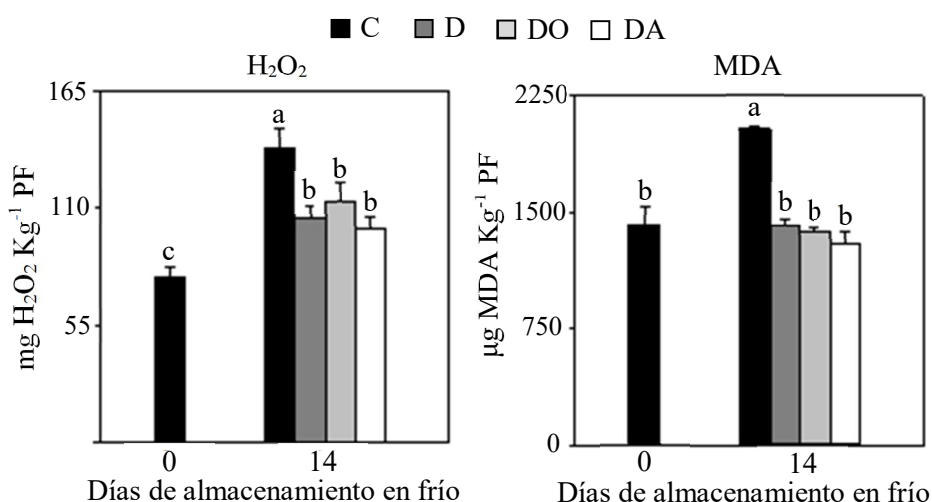


**Fig.I.3:** Cambios en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y peroxidación lipídica (MDA) en frutos control, recubiertos con dextrina (D), dextrina con oleuropeína (DO) y dextrina con aceite (DA), almacenados durante 14 días a 4 °C. Los datos mostrados son medias  $\pm$  ES de tres réplicas biológicas con seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

La pérdida de integridad de membrana es también uno de los primeros eventos causantes de los daños por frío en los frutos sensibles, habitualmente evaluada mediante el nivel de peroxidación lipídica, un parámetro considerado como buen indicador de la susceptibilidad al frío en la fisiología postcosecha. Como se muestra en la figura I.3, todos los recubrimientos aplicados redujeron significativamente el daño en membrana tras 14 días a 4 °C, comparándolos con los frutos control, mostrando valores similares a los que presentaron los frutos

recién cosechados. El uso de ambos aditivos no causó diferencias significativas en peroxidación lipídica respecto a la cubierta basada solamente en dextrina.

#### ***1.2.4. Actividades enzimáticas antioxidantes***

Como se ha descrito previamente, el almacenamiento en frío induce un incremento en los niveles de especies reactivas del oxígeno en frutos sensibles al frío, por lo que la capacidad del tejido para eliminar estas ROS determina la adaptación del fruto a estas condiciones de estrés.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la disrupción del anión superóxido a peróxido de hidrógeno. En los frutos tratados con DO y DA la actividad SOD fue alrededor de un 20% más alta que en el control tras 14 días de almacenamiento (Fig.I.4), lo que podría ayudar a mantener un índice de daños por frío más bajo en estos frutos.

Por otro lado, para reducir el contenido en peróxido de hidrógeno las células vegetales se sirven de un mecanismo enzimático compuesto, entre otras, por ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT). Según muestran los resultados obtenidos en nuestro estudio, los frutos tratados con D y DO tuvieron una mayor actividad APX que los frutos control, siendo los frutos tratados DO los que mostraron los niveles más altos (Fig.I.4). Sin embargo, en los frutos tratados con DA los niveles de APX se mantuvieron similares a los mostrados en los frutos recién cosechados. En el caso de la actividad CAT, los niveles aumentaron con todos los recubrimientos naturales tras el almacenamiento en frío, comparado con los frutos control (Fig.I.4), siendo de nuevo más alta la actividad en los recubrimientos con D y DO que en DA.

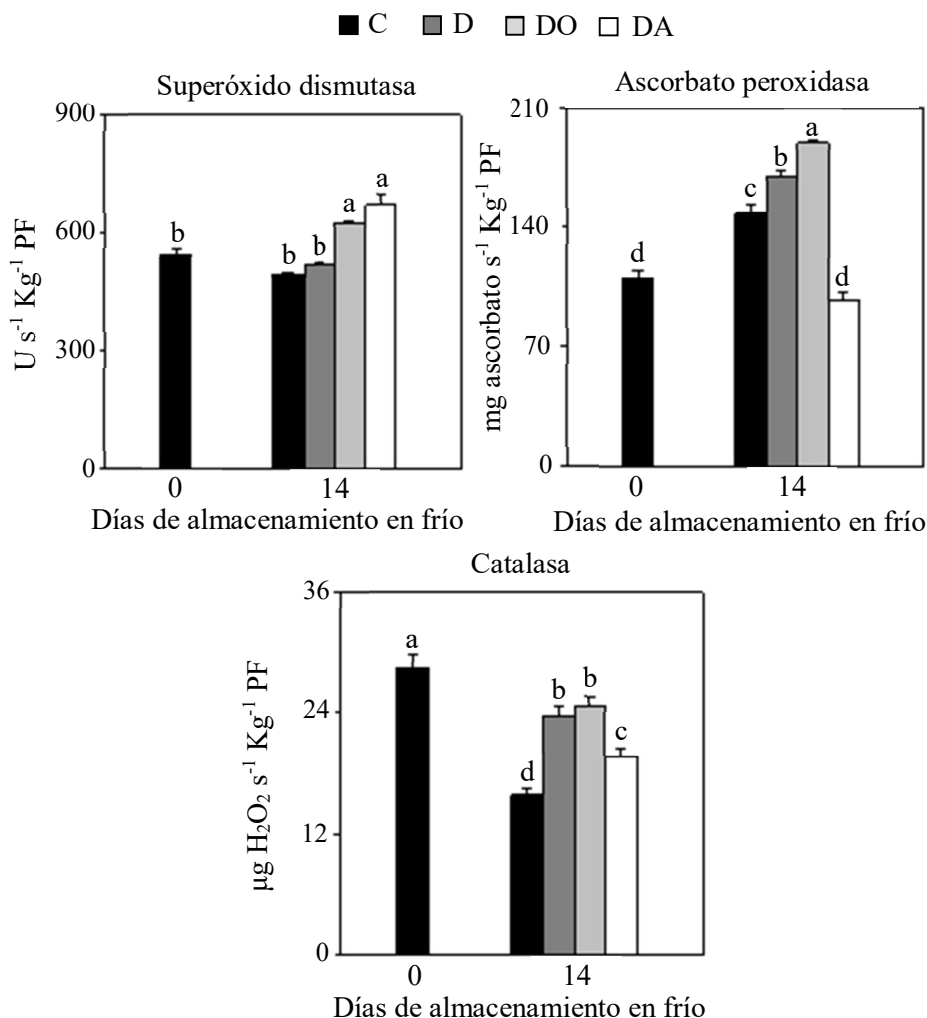


**Fig.1.4:** Cambios en la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT), en frutos control y recubiertos con dextrina (D), dextrina con oleuropeína (DO) y dextrina con aceite (DA), almacenados durante 14 días a 4 °C. Los datos mostrados son medias  $\pm$  ES de tres réplicas biológicas con seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

### I.2.5. Antioxidantes no enzimáticos

En la figura I.5 se muestra el contenido de ascorbato y fenoles totales. El contenido en ascorbato incrementó en todos los frutos debido al almacenamiento en frío. Sin embargo, este aumento fue mayor en aquellos frutos tratados con una cubierta de dextrina, siendo los frutos tratados con DA los que mostraron un mayor aumento, mostrando un contenido un 60% superior a los frutos control tras el almacenamiento en frío (Fig.I.5).

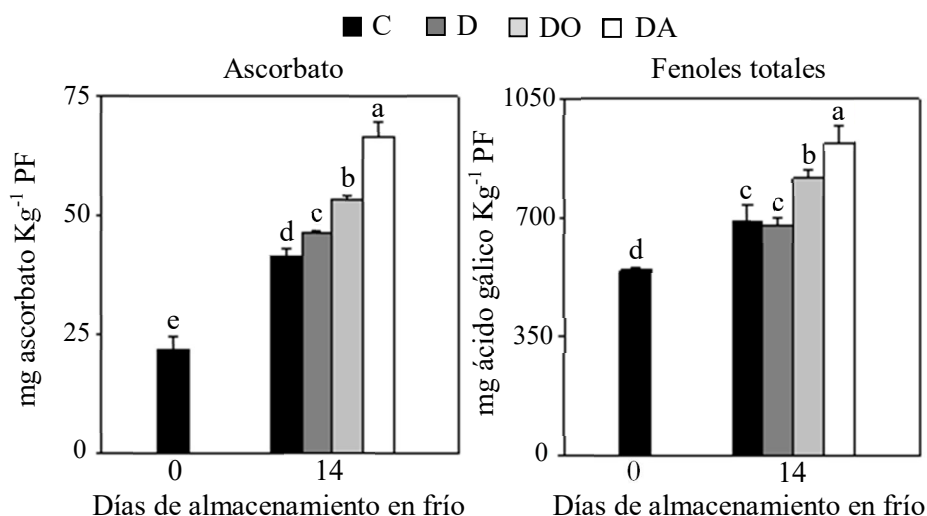


**Fig.I.5:** Contenido en ascorbato y fenoles totales en exocarpo de frutos control, recubiertos con dextrina (D), dextrina con oleuropeína (DO) y dextrina con aceite (DA), almacenados durante 14 días a 4 °C. Los datos mostrados son medias  $\pm$  ES de tres réplicas biológicas con seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

El nivel de compuestos fenólicos incrementó en todos los frutos debido al estrés por frío, siguiendo una tendencia similar a la descrita para el ascorbato. Sin embargo, en este caso sólo los tratamientos DA y DO tienen unos niveles significativamente superiores al control, siendo DA el que mayor contenido mostró con un 33.6% superior al de frutos control (Fig.I.5).

### I.2.6. Enzimas con función oxidativa de compuestos fenólicos

Tras observar la importancia de los compuestos fenólicos en la tolerancia al frío y su respuesta a los tratamientos aplicados, se ha medido la actividad de dos de las principales enzimas que oxidan fenoles, como son la peroxidasa (POD) y la polifenol oxidasa (PPO) (Fig.I.6).

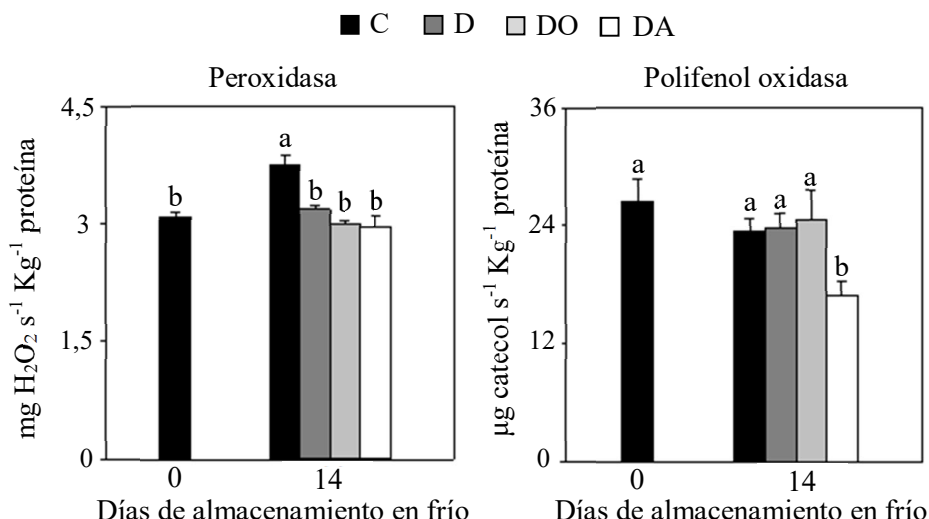


**Fig.I.6:** Actividad peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (PPO) en exocarpo de frutos control, recubiertos con dextrina (D), dextrina con oleuropeína (DO) y dextrina con aceite (DA), almacenados durante 14 días a 4 °C. Los datos mostrados son medias  $\pm$  ES de tres réplicas biológicas con seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

Se detectó un 20% de incremento en la actividad POD en los frutos control debido al almacenamiento en frío, mientras que aquellos en los que se aplicó cualquiera de los recubrimientos basados en dextrina la actividad POD mantuvo durante el periodo de almacenamiento valores similares a los de los frutos recién cosechados (Fig.I.6).

En cuanto a la actividad PPO, el tratamiento de dextrina suplementada con aceite de oliva fue el único capaz de reducir los niveles de actividad PPO (Fig.I.6), llegando a disminuir en un 28% la actividad de esta enzima respecto

al control al final del almacenamiento, lo que es de gran importancia debido a la implicación de esta enzima en la disminución de la calidad del fruto.

### **I.3 Discusión**

Para el mantenimiento de la calidad postcosecha durante el almacenamiento a baja temperatura diferentes recubrimientos polisacarídicos han sido previamente descritos (Ali et al., 2011; Kumar et al., 2017; Nazoori et al., 2023; Valero et al., 2013), y en algunos casos el uso de plastificantes junto a estos recubrimientos ha mejorado la calidad del fruto frente a estrés por frío. Sin embargo, en este estudio se ha demostrado que el uso de glicerol como plastificante empeora las propiedades de las cubiertas polisacarídicas, lo que podría deberse a un incremento en la permeabilidad de la cubierta por este agente plastificante, ya que al aumentar la flexibilidad y resiliencia de ésta se produce al mismo tiempo un aumento en la porosidad de la película (Sothornvit and Krochta, 2005). Los parámetros analizados respecto a calidad del fruto muestran que el recubrimiento con dextrina fue el más eficiente para conservar la calidad postcosecha del fruto de calabacín. En mango un recubrimiento con dextrina también redujo la pérdida de peso, y preservó la apariencia del fruto, sin embargo, sólo el recubrimiento suplementado con aceite de girasol retrasó la maduración, mostrando descomposición de ácidos orgánicos, y retrasando el incremento en contenido de sustancias peptídicas (Ribeiro et al., 2009).

En cuanto al efecto en la tasa de respiración, las cubiertas comestibles basadas en polisacáridos pueden ser utilizadas como una barrera protectora para reducir la tasa respiratoria a través de la superficie del fruto (Jafarzadeh et al., 2021). En nuestro experimento el estrés por frío disminuyó la producción de CO<sub>2</sub> en todos los frutos tras el almacenamiento en frío, esta respuesta podría deberse a la aparición de los daños por frío, de hecho, en mango estos daños reprimen la tasa respiración (Nair and Singh, 2009). Sin embargo, (Balandrán-Quintana et al., 2003) describieron un incremento en la tasa respiratoria como un indicador de la aparición de daños visibles debido al estrés por frío. Esto explicaría que en calabacín los frutos menos dañados, como los del recubrimiento con dextrina, fueran los que mostraron una tasa respiratoria más

alta al final del almacenamiento a 4 °C, mientras que el resto de tratamientos mostraron un elevado índice de daños por frío.

Algunos de los síntomas principales de los daños por frío en el fruto de calabacín son el ablandamiento y la peroxidación lipídica (Carvajal et al., 2017), por ello los datos obtenidos en firmeza en este experimento muestran que la dextrina es la única cubierta natural capaz de evitar el ablandamiento del fruto durante el almacenamiento en frío, resultado que es clave para seleccionar dicho recubrimiento. En otra cucurbitácea como es la sandía se demostró que un recubrimiento a base de alginato y ciclodextrina pudo mantener la firmeza del fruto durante el periodo postcosecha (Sipahi et al., 2013). Este mantenimiento de la firmeza del fruto mediante la utilización de recubrimientos comestibles se debe a una reducción de la actividad de enzimas degradadoras de la pared celular (Afonso et al., 2023). Además, el recubrimiento con dextrina también redujo la peroxidación lipídica en el fruto de calabacín, parámetro que ha sido probado como un buen indicador del estrés por frío, mostrando una correlación positiva con los daños por frío en este fruto (Carvajal et al., 2015b).

Los datos obtenidos en las determinaciones realizadas en nuestro experimento, como pérdida de peso, índice de daños por frío, tasa respiratoria, firmeza y peroxidación lipídica, indican que la dextrina es el mejor polisacárido para llevar a cabo un recubrimiento natural comestible en fruto de calabacín que permita mantener su calidad postcosecha durante el almacenamiento en frío. Además, ésta cubierta es más respetuosa con el medio ambiente, debido a una mayor solubilidad en agua que el resto de polisacáridos, lo que hace que se requiera menor temperatura y tiempo para llevar a cabo la disolución (Islamipour et al., 2022), haciendo más sostenible su empleo a gran escala en la industria hortofrutícola.

En los últimos años, para mejorar las propiedades de las cubiertas comestibles polisacarídicas, ha sido común suplementarlas con aceites esenciales, ceras, lípidos y compuestos antioxidantes purificados (Guerreiro et

al., 2015; Özdemir and Gökmen, 2017; Ribeiro et al., 2009). De hecho, la aplicación en lichi de quitosano con extracto de pomelo redujo significativamente el pardeamiento, pérdida de peso y severidad de los daños, extendiendo la vida postcosecha de este fruto (C. Yang et al., 2023). Debido a que las cubiertas polisacarídicas no son buenas barreras frente a la pérdida de agua (Sothornvit and Krochta, 2005), este tipo de cubiertas podrían mejorarse también con la adición de materiales hidrofóbicos como el aceite de oliva (Guerreiro et al., 2015), para producir una película basada en una emulsión. Por todo esto, se ha investigado el efecto de la aplicación de dextrina junto con oleuropeína purificada de hojas de olivo y aceite de oliva sobre la calidad del fruto. De hecho, los recubrimientos de dextrina combinada con oleuropeína, así como con aceite de oliva, redujeron la pérdida de peso comparándola con el tratamiento de dextrina, sin embargo, sólo la DA redujo notablemente el índice de daños por frío. Este mejor comportamiento de la dextrina suplementada con aceite probablemente se debe a la hidrofobicidad del aceite y su habilidad para ocupar regiones amorfas de la cubierta polisacarídica (Shiekh et al., 2022). En higos recubiertos con un compuesto en base a emulsiones de quitosano y alginatos con aceite de oliva, se detectó una reducción de la pérdida de peso durante el almacenamiento en frío, así como también un mantenimiento en la firmeza (Vieira et al., 2021). En tomate, una emulsión de quitosano con aceite de oliva también mantuvo la firmeza del fruto y retrasó la madurez (Dovale-Rosabal et al., 2015). Resultados similares se obtuvieron en caqui con gelatina y aceite de piel de rana (Kingwascharapong et al., 2020), así como en pera, granada y carambolo, reduciendo los daños por frío con el uso de cubiertas basadas en lípidos (Adhikary et al., 2022; Barman et al., 2011; Zaki et al., 2012).

El estrés generado en el fruto por el almacenamiento en frío genera un incremento en especies reactivas del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La utilización de estos recubrimientos naturales en base a dextrina redujo significativamente el contenido en peróxido de hidrógeno en exocarpo

del fruto de calabacín. De acuerdo con estos resultados, en el estudio ofrecido por (Mahmoudi et al., 2022) observaron que ciruela tratada con quitosano mostró menos contenido en  $H_2O_2$ , debido a una mayor actividad de enzimas antioxidantes. Sin embargo, a pesar del hecho de que los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva son potentes antioxidantes (Ricelli et al., 2020), y que la oleuropeína es también un compuesto fenólico capaz de degradar radicales libres (Jemai et al., 2008), estos aditivos no redujeron el contenido en peróxido de hidrógeno y la peroxidación lipídica del fruto de calabacín frente a frutos tratados sólo con dextrina. Este efecto mostrado por la dextrina se ha observado en otros frutos, como en pomarrosa, con diferentes recubrimientos basados en alginatos (Duong et al., 2022), así como en cubierta de quitosano y nanopartículas de arginina, retrasando los daños por frío mediante la reducción del estrés oxidativo, manteniendo la integridad de membrana y evitando la peroxidación lipídica (Mahmoudi et al., 2022). Según nuestros resultados, la utilización de recubrimientos basados en dextrina es capaz de mejorar la apariencia visual y retrasar la aparición de daños por frío en el fruto de calabacín mediante la reducción en la peroxidación lipídica y en el contenido en  $H_2O_2$ .

En trabajos anteriores, se ha descrito que diferentes tratamientos que mantienen la calidad postcosecha del fruto de calabacín durante su almacenamiento a bajas temperaturas, incrementan los mecanismos de eliminación de ROS (Carvajal et al., 2015b; Palma et al., 2016). La protección celular contra los daños por frío está directamente relacionada a ciertas enzimas clave con actividad antioxidante, como son SOD, APX o CAT (Jiménez-Muñoz et al., 2021; Sharma et al., 2020; Yao et al., 2018), pudiendo mejorarse esta respuesta añadiendo aditivos como ácidos grasos (He et al., 2021). En el caso de APX, varios recubrimientos se han probado para incrementar su actividad, ayudando a disminuir la concentración de  $H_2O_2$  (W. Hu et al., 2022; Saleem et al., 2020; Suresh et al., 2022). Las enzimas APX y CAT cooperan para la protección frente al peróxido de hidrógeno generado durante el

almacenamiento a baja temperatura (Mizuno et al., 1998). Un aumento en la actividad catalasa se ha descrito previamente en fresas a las que se les ha aplicado diferentes recubrimientos basados en quitosano, manteniendo esta enzima unos altos niveles de actividad durante el almacenamiento a 5 °C (Wang and Gao, 2013). Frutos de caqui recubiertos con goma arábrica también mostraron mayores niveles de actividad SOD, APX y CAT (Saleem et al., 2020). En fruto de calabacín, distintos tratamientos que retrasan los daños por frío y extienden la vida útil del fruto también inducen las actividades SOD, APX y CAT (Carvajal et al., 2015b; Palma et al., 2016). En nuestro caso la utilización de un recubrimiento con dextrina, y aditivado con oleuropeína, incrementa las actividades SOD, APX y CAT tras el almacenamiento en frío, siendo incluso mayores las actividades SOD y APX en DO comparado con D. En cambio, en los frutos tratados con DA los niveles de APX se mantuvieron similares a los mostrados en los frutos recién cosechados. En fruto de otra cucurbitácea como el pepino, se ha descrito que el recubrimiento con aceite de alcaravea enriquecido con ácido salicílico aumentó la actividad de las enzimas SOD, POD y CAT bajo condiciones de estrés por frío (Hanaei et al., 2022). También en guayaba la combinación de goma arábrica, ácido oleico y aceite esencial de canela incrementaron la actividad antioxidante en el fruto (Etemadipoor et al., 2020).

Los antioxidantes no enzimáticos, como son el ascorbato, fenoles o glutatión, son pequeñas moléculas cuya función es suprimir la acción de los radicales libres (Blokhina et al., 2003). En el fruto de calabacín se ha descrito que el ascorbato alivia el daño oxidativo a través de la eliminación de radicales durante el almacenamiento postcosecha (Carvajal et al., 2015b; Palma et al., 2016). La aplicación de recubrimientos comestibles a guayaba, caqui y tomate también incrementó los niveles de ascorbato durante el almacenamiento postcosecha, contribuyendo a disminuir el estrés oxidativo (Gurjar et al., 2018; Saleem et al., 2020; Suresh et al., 2022). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que contribuyen al valor nutricional de frutos y

vegetales, incrementando también su capacidad antioxidante (Molla et al., 2022), siendo de vital importancia en el sistema de defensa antioxidante frente al estrés por frío durante el almacenamiento de los frutos (Castro-Cegri et al., 2023c; Sayyari et al., 2011). Estos compuestos además mejoran la calidad nutracéutica del fruto (Cheng et al., 2020), con gran importancia para la salud humana (Jideani et al., 2021; Swallah et al., 2020). Una disminución de fenoles totales en fruto, se ha relacionado con un aumento en los daños por frío, ya que diferentes tratamientos capaces de aumentar el contenido de estos compuestos aliviaron la aparición de dicho desorden fisiológico (Ngaffo Mekontso et al., 2021; L. Wang et al., 2019a; L. Zhang et al., 2022). Los recubrimientos naturales utilizados en nuestro experimento incrementaron el contenido de antioxidantes no enzimáticos como el ascorbato y los fenoles totales, siendo el tratamiento con DA el que mostró mayor contenido de estos antioxidantes, éste comportamiento se puede asociar a lo descrito en la sección anterior, donde el tratamiento con DA mantuvo los niveles de APX al mismo nivel que los recién cosechados y CAT más bajo que los otros recubrimientos de dextrina, por lo que el mecanismo de detoxificación de ROS podría verse incrementado en este tratamiento mediante el sistema antioxidante no enzimático. El uso de cubiertas comestibles en fresa y caqui también incrementó el contenido en fenoles durante el periodo postcosecha (Mousavi et al., 2021; Saleem et al., 2020). Este incremento de los antioxidantes no enzimáticos colabora junto con las actividades enzimáticas antioxidantes en la eliminación de ROS, y por lo tanto en la reducción de la aparición de daños por frío.

Las peroxidasas (POD) y polifenol oxidasas (PPO) son unas de las principales enzimas responsables de la pérdida de calidad del fruto debido a su actividad de degradación de compuestos fenólicos (Tomás-Barberán and Espín, 2001). Por este motivo, se ha demostrado que ambas enzimas están involucradas en el desarrollo de varios desórdenes fisiológicos, como son los daños por frío (Trejo-Márquez et al., 2010). En distintos frutos, se ha demostrado que se induce la actividad POD debido al almacenamiento a bajas

temperaturas (Ali et al., 2022; Habibi et al., 2022; Wang, 1995). En mandarinas, se describió una correlación positiva de la sensibilidad al frío de la piel del fruto con la inducción de POD durante el almacenamiento (El-hilali et al., 2003). Sin embargo, el uso de recubrimientos basados en quitosano ayudó a inhibir dicha actividad durante el periodo postcosecha (Shiekh et al., 2013). Otras cubiertas comestibles también inhibieron las actividades POD y PPO en fresas almacenadas a 4 °C, y consecuentemente, los niveles totales de compuestos fenólicos en los frutos tratados con estas películas se mantuvieron más elevados que en los frutos control (Mousavi et al., 2021). Mahmoudi et al., (2022) describió que la aplicación de quitosano con nanopartículas de arginina indujo resistencia a los daños por frío en ciruela, mediante una disminución en la actividad PPO. De acuerdo a estos resultados, todos los recubrimientos comestibles usados en nuestro experimento redujeron la actividad POD, pero sólo el tratamiento DA disminuyó la actividad PPO. De esta forma, el recubrimiento natural DA es el más eficiente para prolongar la vida postcosecha del fruto de calabacín, tanto porque reduce ambas actividades enzimáticas que oxidan fenoles, como porque incrementa el contenido de antioxidantes no enzimáticos como los fenoles libres y el ascorbato, reduciendo así el estrés oxidativo en el fruto, lo que permite reducir los daños por frío.

## **Capítulo II. El tratamiento con ácido abscísico modula el metabolismo primario y la biosíntesis de t-zeatina y riboflavina en fruto de calabacín expuesto a estrés por frío**

*Castro-Cegri, A., Carvajal, F., Osorio, S., Jamilena, M., Garrido, D., Palma, F. (2023). Postharvest abscisic acid treatment modulates the primary metabolism and the biosynthesis of t-zeatin and riboflavin in zucchini fruit exposed to chilling stress.*

*Postharvest Biology and Technology. 204, 112457.*



## II.1 Introducción

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que desempeña un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de los vegetales, actuando además como un regulador de la defensa frente a varios estreses abióticos, como salinidad, sequía, desecación y bajas temperaturas (Guajardo et al., 2016; Hussain et al., 2021; Y. Zhao et al., 2022). El estrés por frío es un factor que provoca enormes pérdidas durante el almacenamiento a bajas temperaturas en una amplia diversidad de frutos como el calabacín, debido a su origen subtropical y a que se cosecha en estado inmaduro. En el fruto de calabacín se ha demostrado el papel del ABA en la inducción de la tolerancia al frío, observándose una acumulación de esta fitohormona en variedades tolerantes al frío durante los primeros días de almacenamiento a 4 °C (Carvajal et al., 2017). Además, la aplicación exógena de ABA en frutos de calabacín indujo cambios transcriptómicos en *Cucurbita pepo* mediante RNA-seq, especialmente en factores de transcripción, enzimas degradadoras de membrana y pared celular, así como en reguladores de la síntesis de otras hormonas como jasmonato, etileno, auxina y brasinoesteroides (Benítez et al., 2022). Se ha descrito que el ABA disminuye los daños por frío en frutos almacenados a bajas temperaturas, activando los mecanismos de defensa antioxidantes e induciendo la acumulación de osmoprotectores (Jixing Tang et al., 2022; Y. Zhao et al., 2022), compuestos que pueden acumularse en elevadas concentraciones en la célula vegetal sin perturbar las reacciones bioquímicas intracelulares, destacando con este papel a los carbohidratos, aminoácidos, glicina betaína o poliaminas (Verslues et al., 2006). En estudios previos se ha demostrado la importancia de estos osmolitos en la tolerancia al frío del fruto de calabacín (Palma et al., 2014a, 2014b, 2019a), sin embargo, no se ha establecido una relación entre el metabolismo del fruto y el ABA.

Por lo tanto, sabiendo que el ABA está implicado en la adquisición de la resistencia al frío en calabacín (Carvajal et al., 2017), es importante investigar los cambios metabólicos que tienen lugar en el fruto durante la postcosecha

inducidos por la aplicación de esta fitohormona. En resumen, el objetivo de este trabajo ha sido, primeramente, utilizar un enfoque metabolómico dirigido a caracterizar cambios en la composición de metabolitos primarios inducidos por el tratamiento con ABA durante el almacenamiento en frío. Sin embargo, una amplia variedad de metabolitos desconocidos podría estar involucrada en la tolerancia al frío inducida por ABA. Para identificar posibles nuevas moléculas implicadas, se utilizó un análisis UPLC-QTOF/ESI-MS (ver apartado de MyM 3.7.1) con el que caracterizar vías metabólicas secundarias claves de la resistencia al frío e inducidas por ABA.

## II.2 Resultados

### II.2.1. ABA y calidad postcosecha

Para evaluar el efecto de la aplicación de la fitohormona en la calidad postcosecha del fruto de calabacín se midieron la pérdida de peso, los daños por frío y la pérdida de electrolitos, después de 1, 5 y 14 días de almacenamiento en frío (Tabla II.1). El tratamiento con ABA disminuyó significativamente estos parámetros en frutos de una variedad de calabacín sensible al frío, mostrando las mayores diferencias respecto a los frutos control tras 5 y 14 días de almacenamiento a 4 °C (Tabla II.1). Al final del tiempo de almacenamiento la aplicación de ABA redujo la pérdida de peso en un 30%, la pérdida de electrolitos en un 25% y el índice de daños por frío fue 3 veces inferior al del fruto control (Tabla II.1).

**Tabla II.1:** Cambios en el porcentaje de pérdida de peso (%), daños por frío en una escala de 0 a 3 y pérdida de electrolitos (%) en frutos control y tratados con ABA (0.5 mM) durante el periodo de almacenamiento a 4 °C (0, 1, 5 y 14 días).

| Días en frío                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0                    | 1                     |                      | 5                     |                      | 14                    |                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                               |                      | Control               | ABA                  | Control               | ABA                  | Control               | ABA                   |
| Pérdida de peso (%)                                                                                                                                                                                                                                                           | 0±0 <sup>f</sup>     | 1.4±0.1 <sup>e</sup>  | 1.5±0.1 <sup>e</sup> | 4.1±0.1 <sup>c</sup>  | 3.4±0.1 <sup>d</sup> | 12±0.4 <sup>a</sup>   | 8.4±0.7 <sup>b</sup>  |
| Daños por frío (0-3)                                                                                                                                                                                                                                                          | 0±0 <sup>c</sup>     | 0±0 <sup>c</sup>      | 0±0 <sup>c</sup>     | 0.2±0.1 <sup>c</sup>  | 0±0 <sup>c</sup>     | 2.2±0.2 <sup>a</sup>  | 0.7±0.2 <sup>b</sup>  |
| Pérdida de electrolitos (%)                                                                                                                                                                                                                                                   | 6.5±0.2 <sup>c</sup> | 10.1±0.4 <sup>c</sup> | 7.6±0.2 <sup>d</sup> | 11.2±0.3 <sup>b</sup> | 8±0.1 <sup>d</sup>   | 14.8±0.3 <sup>a</sup> | 11.3±0.5 <sup>b</sup> |
| Los datos presentados son medias de tres réplicas biológicas, de seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras en cada periodo de almacenamiento para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ). |                      |                       |                      |                       |                      |                       |                       |

### II.2.2. Efecto del ABA en el perfil de metabolismo primario

Se detectaron un total de 57 metabolitos primarios polares, incluyendo 25 aminoácidos, 16 azúcares y derivados, y 10 ácidos orgánicos. El análisis de

componentes principales (PCA) se utilizó para investigar cambios en la inducción de metabolitos primarios por la aplicación de ABA durante el almacenamiento en frío. El PCA reveló un 47 % de variación considerando los dos componentes principales PC1 y PC2 (Fig.II.1A).

Los frutos tratados con ABA se observan claramente separados del control tras 1 y 5 días de almacenamiento, mientras que al final del tiempo de experimentación ambos tratamientos se agruparon. Excepto para las muestras de 14 días, los frutos tratados con ABA se localizaron en la parte izquierda del gráfico, señalando la importancia del PC1 en su separación. En la gráfica “PCA loading plot” se dispusieron aquellos metabolitos que más contribuyeron a este agrupamiento de las muestras (Fig.II.1B). En el cuadrante superior izquierdo encontramos los metabolitos más relevantes con la separación de los frutos tratados con ABA después de 1 día a 4 °C, entre ellos homoserina, glicina, ácido cítrico y glicerol 3-fosfato. Los metabolitos mostrados en el cuadrante inferior izquierdo fueron más relevantes en los frutos tratados con ABA después de 5 días de almacenamiento en frío, como la ornitina, el ácido glutámico, pirúvico y galacturónico, mientras que putrescina, 4-hidroxiprolina, triptófano, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y fosfato, se situaron en el cuadrante inferior derecho, correspondiente al metabolismo del calabacín tras un largo almacenamiento en frío.

Para analizar la importancia de los diferentes grupos de metabolitos polares primarios, en el perfil metabólico, se realizaron PCAs independientes usando los datos correspondientes a aminoácidos, azúcares y sus derivados, así como para ácidos orgánicos. Los resultados mostraron que los aminoácidos fueron el grupo más importante para la separación entre fruto control y tratado con ABA (Fig.II.2).

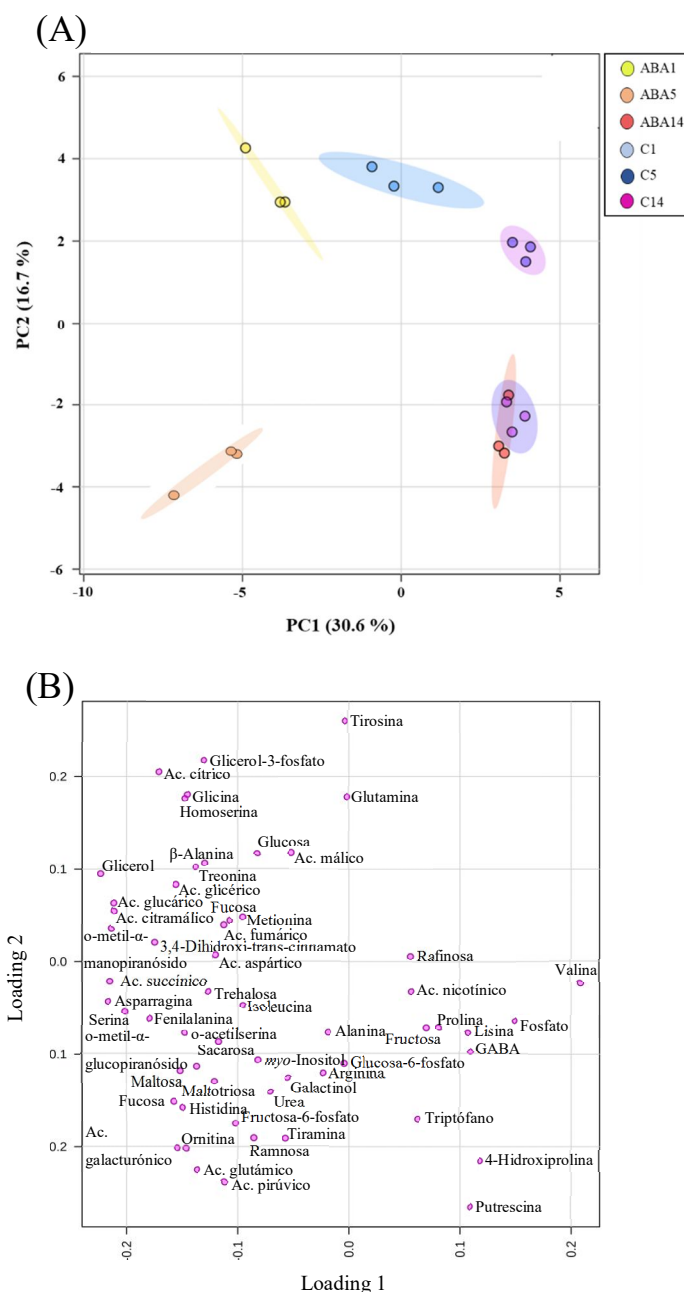


**Fig.II.1:** Análisis de componentes principales (PCA) en metabolitos primarios en frutos control y tratados con ABA tras 1, 5 y 14 días de almacenamiento. (A) Gráfica con resultados por grupo del análisis de componentes principales. Los valores en paréntesis son el porcentaje variación explicada por cada componente principal (PC). (B) Representación de los metabolitos más influyentes en la separación del PCA. Se usaron tres replicas biológicas (n=3) con 6 frutos cada una.

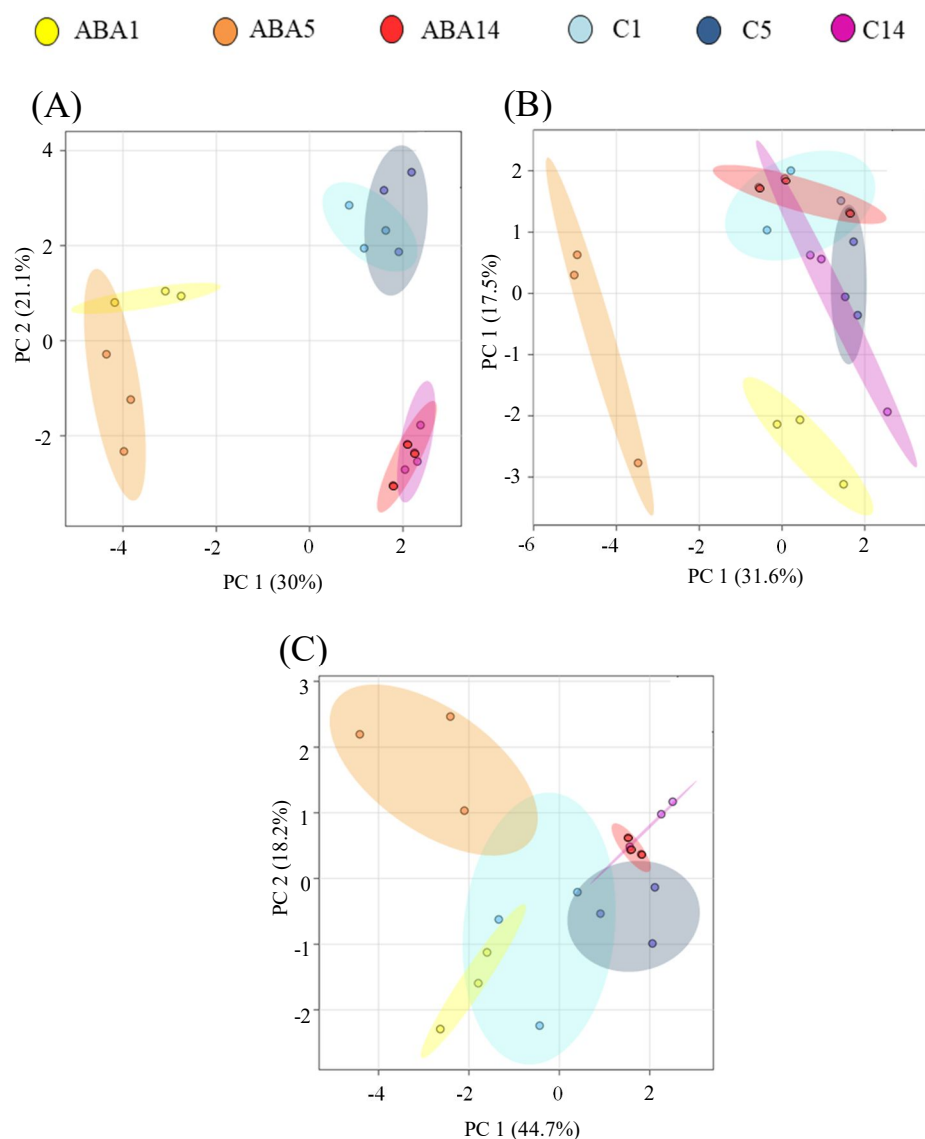


**Fig.II.2:** Análisis de componentes principales (PCA) scores plots, en aminoácidos (A), azúcares y derivados (B), y ácidos orgánicos (C), en frutos control (C) y tratados con ABA (ABA) tras 1, 5 y 14 días de almacenamiento. Los valores en paréntesis son el porcentaje variación explicada por cada componente principal (PC).

Un análisis discriminante por mínimos cuadrados (PLS-DA) se llevó a cabo usando los metabolitos medidos como variables de predicción, y el desarrollo de daños por frío o la aplicación de ABA como variables respuesta. Usando los daños por frío como respuesta, la gráfica “scores plot” del modelo PLS-DA separó las muestras de los frutos dañados de los no dañados, siendo el porcentaje de varianza explicado, usando los dos componentes, de alrededor del 45 % (Fig.II.3A). El análisis que mide la importancia de las variables en la proyección (VIP score) muestra la contribución de las variables predictoras, en este caso los metabolitos medidos, en el modelo. La gráfica del VIP score para los metabolitos más importantes identificados por el PLS-DA se muestra en la figura II.3B. Valina, putrescina y GABA mostraron una correlación positiva con el desarrollo de los daños por frío. Por el contrario, beta-alanina, serina, aspártico, glicina, asparagina, succínico, glicerol-3-fosfato, 3,4-dihidroxi-trans-cinámico, ácido cítrico, glucárico, citramálico y glicerol mostraron un mayor contenido en los frutos no dañados (Fig.II.3B). Los cambios en estos metabolitos a lo largo del almacenamiento en los frutos control y tratados con ABA están resumidos en la figura II.4.

Los scores del modelo PLS-DA, usando el tratamiento de ABA como variable respuesta, separaron las muestras de frutos tratados de los no tratados, excepto para aquellos correspondientes a 14 días de almacenamiento a 4 °C (Fig.II.3C). Este comportamiento se debe a similitudes encontradas en el perfil metabólico primario presentado en estas muestras, como se puede ver en la gráfica PCA scores (Fig.II.1A). El porcentaje de varianza explicada utilizando ambos componentes fue en este caso alrededor del 43%. Algunos compuestos importantes para el modelo PLS-DA relacionados positivamente con la aplicación de ABA fueron histidina, fenilalanina, glutámico, ornitina, maltotriosa y fucosa. Otros metabolitos que también presentaron una correlación positiva con el tratamiento con ABA y un mayor contenido en frutos no dañados en el modelo PLS-DA, hecho utilizando el tratamiento con

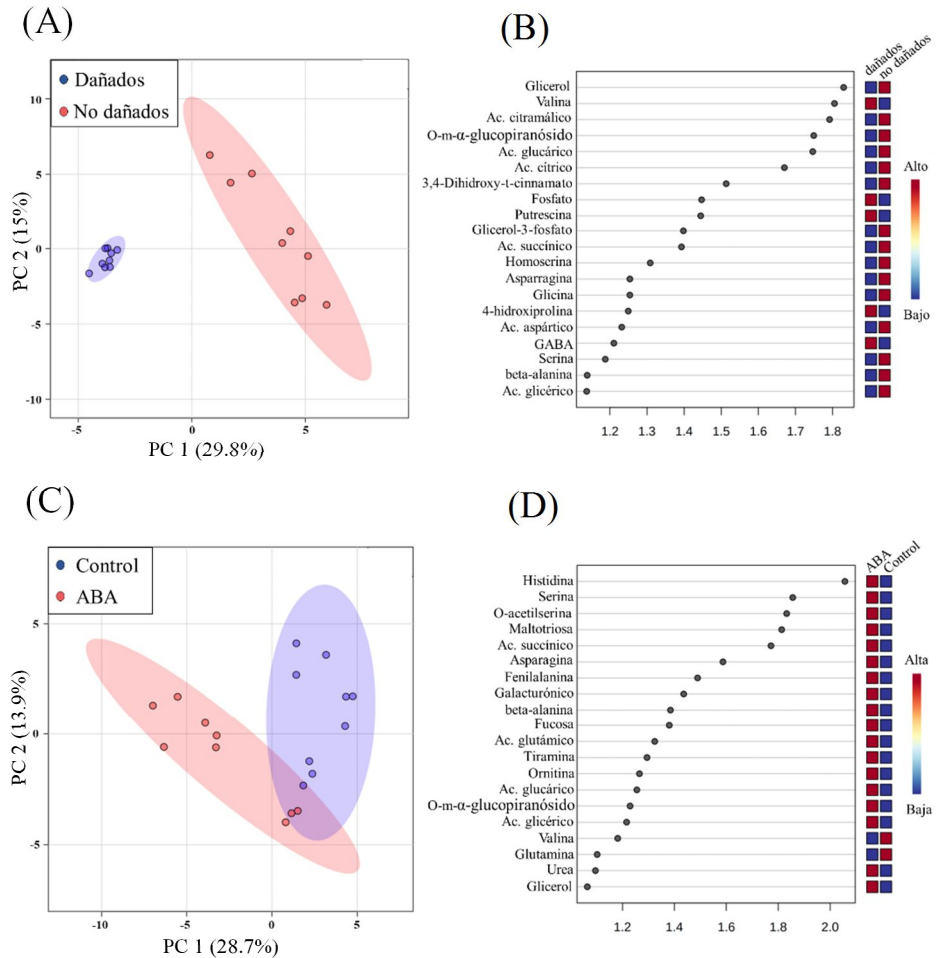


**Fig.II.3:** Análisis discriminante mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) del desarrollo de daños por frío o la aplicación de ABA en el exocarpo de calabacín durante el almacenamiento en frío. (A) Gráfica PLS-DA del modelo construido usando daños por frío como variable respuesta. (B) Variable importance in projections (VIP) scores de los metabolitos identificados como más importantes por el modelo PLS-DA para daños por frío. (C) Gráfica PLS-DA del modelo construido usando tratamiento con ABA como variable respuesta. (D) Variable importance in projections (VIP) scores de los metabolitos identificados más importantes por el modelo PLS-DA para tratamiento con ABA. Los valores en paréntesis corresponden a la varianza explicada por cada componente. Se usaron tres réplicas biológicas (6 frutos cada una) para control y tratamiento con ABA a 1, 5 y 14 días de almacenamiento en frío.

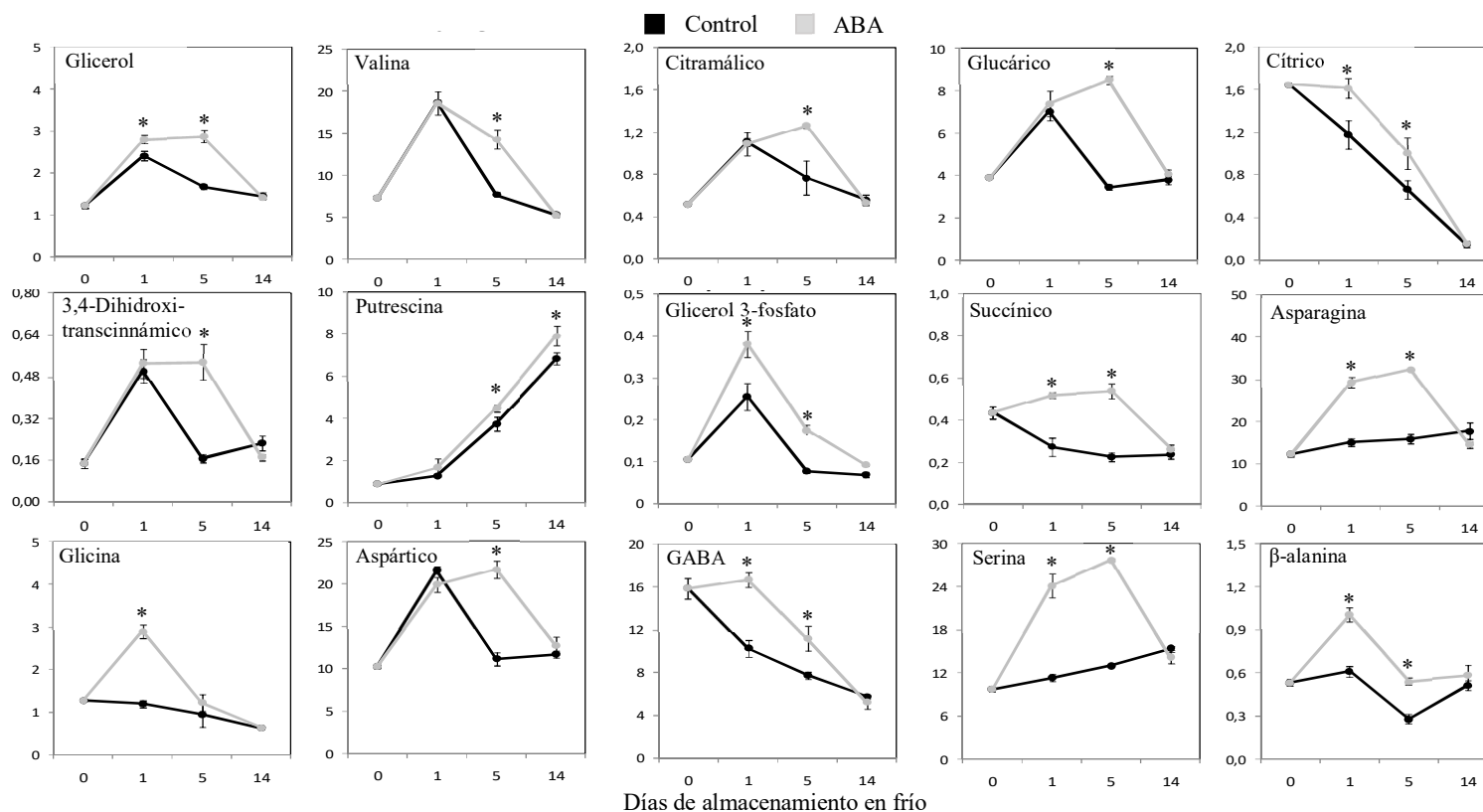


**Fig.II.4:** Cambios en los niveles de los metabolitos identificados más importantes por PLS-DA para daños por frío en frutos control y tratados con ABA a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento en frío. Asteriscos muestran diferencias significativas entre los tratamientos para cada día de almacenamiento por test Duncan  $p < 0.05$ .

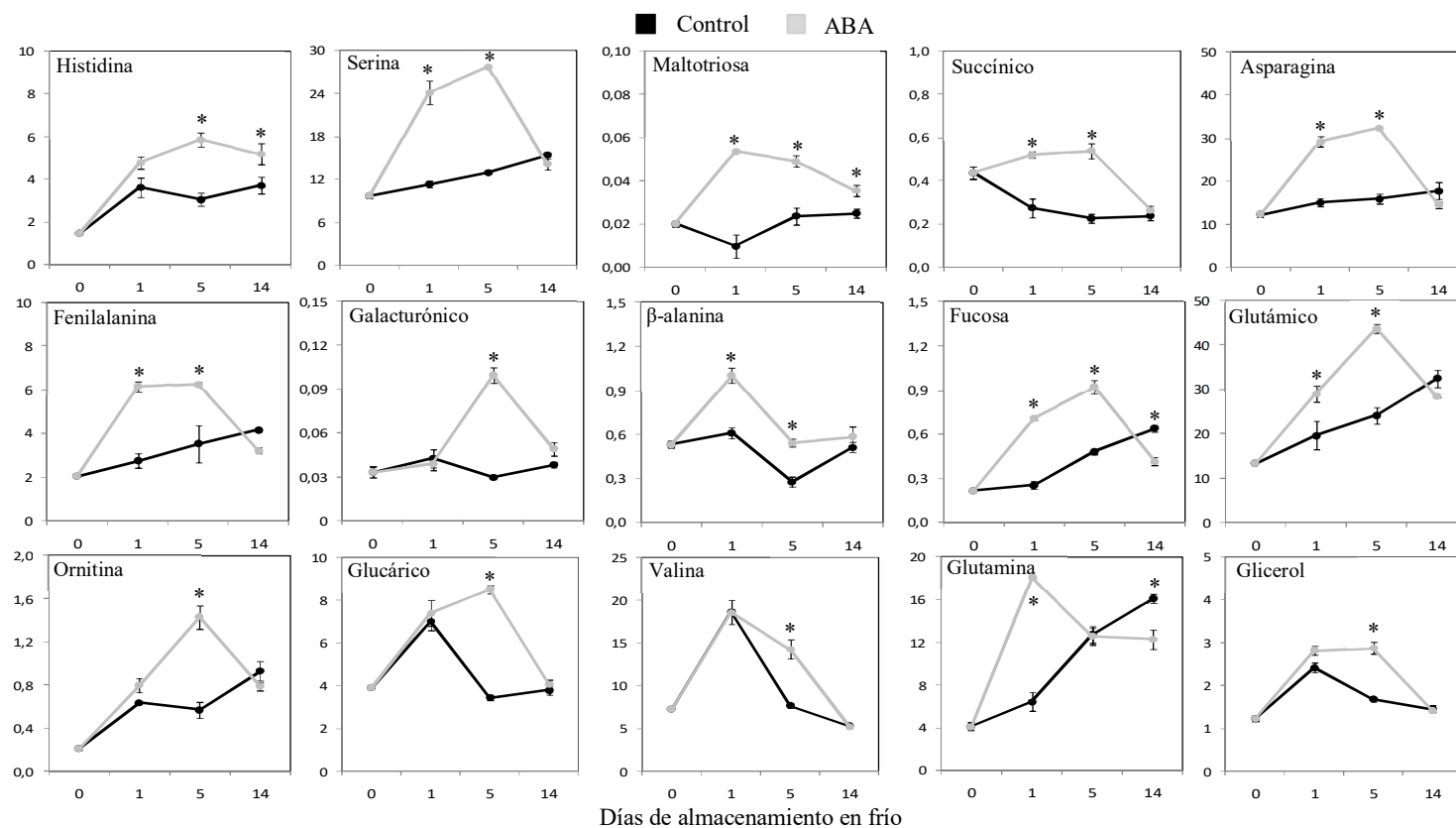


**Fig.II.5:** Cambios en los niveles de los metabolitos identificados más importantes por PLS-DA para tratamiento con ABA en frutos control y tratados con ABA a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento en frío. Asteriscos muestran diferencias significativas entre los tratamientos para cada día de almacenamiento por test Duncan  $p < 0.05$ .

ABA como respuesta, fueron glicerol, succínico y glucárico, así como los aminoácidos serina, asparagina y  $\beta$ -alanina (Fig.II.3D). Por otra parte, los aminoácidos glutamina y valina presentaron una correlación negativa con el tratamiento con ABA, presentando valina además un alto VIP score en el modelo PLS-DA, correlacionado positivamente con la aparición de daños por frío. Los cambios en los niveles de estos metabolitos durante el almacenamiento en frío se han representado en la figura II.5.

### II.2.3. Perfil metabólico no dirigido

El análisis inicial en UPLC-QTOF/ESI-MS de todas las muestras detectó un total de 3990 compuestos diferentes. Sin embargo, sólo 186 iones discriminantes se seleccionaron por un coeficiente de correlación de Pearson ( $r \geq 0.85$ ) para su identificación. El procesado de los datos nos permitió identificar 78 metabolitos que cuya concentración fue modificada significativamente por el tratamiento con ABA. Una completa descripción de dichos metabolitos se puede encontrar en la tabla II.2, incluyendo  $m/z$ , información de fragmentación y KEGG IDs. Con el objetivo de aclarar la posible implicación de estos compuestos se llevó a cabo un análisis de mapeo de rutas.

**Tabla II.2:** Nombre, tamaño ( $m/z$ ), tiempo de retención ( $R_t$ ), fórmula molecular y KEGG ID de cada metabolito identificado, así como tres de sus fragmentos más significativos para el diagnóstico.

| Metabolitos anotados<br>(nombre) | $m/z$    | $R_t$ (min) | Fórmula<br>molecular  | Fragmentación<br>( $m/z$ ) | KEGG<br>ID |
|----------------------------------|----------|-------------|-----------------------|----------------------------|------------|
| 3-oxo-dodecanoate                | 215.0861 | 0.7419      | $C_{12}H_{22}O_3$     | 179.13; 156.07;<br>142.10  | C02367     |
| 2-phosphoglyceric acid           | 187.1138 | 8.1663      | $C_3H_7O_7P$          | 151.99; 138.99;<br>135.99  | C00631     |
| D-ribose                         | 151.0947 | 1.1165      | $C_5H_{10}O_5$        | 132.04; 114.04;<br>84.03   | C00121     |
| 4-methylumbelliferyl<br>acetate  | 219.0062 | 1.0944      | $C_{12}H_{10}O_4$     | 205.05; 202.07;<br>177.06  | C03837     |
| Dehydroascorbic acid             | 175.0458 | 12.0781     | $C_6H_6O_6$           | 174.01; 158.02;<br>157.01  | C00425     |
| Guanosine<br>monophosphate       | 364.0609 | 8.1656      | $C_{10}H_{14}N_5O_8P$ | 345.05; 327.04;<br>317.06  | C00144     |
| 2-monoacylglycerol               | 357.2593 | 12.9708     | $C_{21}H_{40}O_4$     | 326.24; 286.21;<br>241.18  | C02112     |
| Pimpinellin                      | 247.1338 | 8.2159      | $C_{13}H_{10}O_5$     | 247.06; 233.04;<br>215.00  | C09285     |

|                                             |          |         |                                                                               |                        |        |
|---------------------------------------------|----------|---------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------|
| 10-hydroxy dihydrosanguinarine              | 350.0806 | 8.1708  | C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub>                               | 306.11; 303.05; 285.04 | C05247 |
| Erythrose-4-P                               | 201.1265 | 8.18    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> P                                | 199.00; 180.99; 156.02 | C00279 |
| 5-phosphomevalonate                         | 229.1213 | 8.1907  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> P                               | 229.04; 214.02; 184.05 | C01107 |
| Sakuranetin                                 | 287.1258 | 8.2247  | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>                                | 269.07; 245.07; 137.01 | C09833 |
| Glucobacteroin                              | 436.9385 | 0.7748  | C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>9</sub> S <sub>3</sub>                | 365.00; 353.00; 283.01 | C08401 |
| 2-aminoadipic acid                          | 162.9926 | 0.1616  | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>                                | 144.06; 131.06; 110.03 | C00956 |
| 8'-hydroxyabscitate                         | 280.9857 | 1.0613  | C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>                                | 182.07; 165.04; 147.04 | C15514 |
| Isopentenyladenosine-5-diphosphate          | 492.2099 | 4.6639  | C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> P <sub>2</sub> | 459.07; 407.04; 346.05 | C16426 |
| D-threo-isocitrate                          | 189.1562 | 0.7307  | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>                                  | 173.01; 124.02; 114.99 | C00451 |
| 10-deacetyl-2-debenzoylbaccatin III         | 441.1868 | 12.7304 | C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>                                | 407.18; 405.18; 366.19 | C11899 |
| Indole-3-acetohydroximoyl-cysteinylglycine  | 350.9897 | 11.3325 | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S               | 350.09; 314.06; 298.08 | C16518 |
| Glucotropaeolin                             | 409.9927 | 3.3711  | C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>9</sub> S <sub>2</sub>                | 343.02; 286.97; 286.00 | C10646 |
| Lipoic acid                                 | 207.0651 | 7.9558  | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>                  | 207.04; 206.05; 189.03 | C16241 |
| S-(4-methylthiobutylhydroxymoyl)-L-cysteine | 253.1437 | 11.6435 | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>   | 236.06; 223.06; 207.04 | C17242 |
| 3-sinapoyloxypropylglucosinolate            | 584.0748 | 0.8859  | C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>14</sub> S <sub>2</sub>               | 568.07; 483.11; 327.07 |        |
| Curcumin monoglucoside                      | 532.0905 | 3.4823  | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>                               | 453.14; 425.12; 319.08 | C17749 |
| 12a-hidroxyrotenone                         | 411.9324 | 0.9699  | C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>                                | 355.07; 256.07; 185.05 | C10464 |
| Sinapoyl aldehyde                           | 371.0601 | 2.6574  | C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>                                | 289.02; 179.02; 176.00 | C05610 |
| Cinnamoyl-β-D-glucoside                     | 311.1258 | 6.474   | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>                                | 310.09; 274.08; 226.06 | C04164 |
| Phaselate                                   | 297.049  | 1.2171  | C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>                                | 279.04; 162.03; 140.97 | C10483 |
| 5-methylthioinosine                         | 299.2324 | 8.3345  | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S               | 285.07; 267.09; 264.07 | C19787 |
| Cystine                                     | 241.108  | 3.5284  | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>   | 211.02; 208.98; 182.05 | C00491 |
| Gingerol                                    | 294.2433 | 12.2737 | C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>                                | 246.12; 236.09; 192.08 | C10462 |
| 2-deoxycytidine                             | 228.1929 | 12.6036 | C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>                  | 211.07; 209.07; 190.05 | C00881 |
| Trans-zeatin riboside monophosphate         | 430.2286 | 12.9913 | C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> P               | 366.13; 317.10; 304.14 | C16430 |

|                                      |          |         |                                                                               |                           |        |
|--------------------------------------|----------|---------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------|
| S-formylglutathione                  | 337.0035 | 0.7361  | C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S               | 289.08; 282.04;<br>253.02 | C01031 |
| Orotidine 5'-phosphate               | 369.0249 | 0.7387  | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> P              | 350.01; 292.02;<br>281.03 | C01103 |
| Guanosine                            | 284.1125 | 1.0198  | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>                 | 284.09; 232.05;<br>231.04 | C00387 |
| CDP-N-dimethylethanolamine           | 476.0896 | 4.9401  | C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> P <sub>2</sub> | 384.99; 323.04;<br>319.05 |        |
| S-ribosyl-L-homocysteine             | 268.0693 | 0.8858  | C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub> S                              | 215.04; 196.05;<br>176.04 | C03539 |
| Albendazole sulfoxide                | 282.2763 | 12.7807 | C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S               | 252.08; 237.02;<br>221.06 | C02809 |
| Flavin mononucleotide                | 457.1045 | 7.2561  | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> P               | 396.09; 384.05;<br>338.06 | C00061 |
| N-ethyladenine                       | 164.0705 | 1.4489  | C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub>                                  | 162.07; 149.06;           |        |
| Glucaric acid                        | 211.1689 | 8.1885  | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>                                 | 175.03; 162.05;<br>149.03 | C00818 |
| Uridine 5'-diphosphate               | 404.9986 | 0.8493  | C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> P <sub>2</sub>  | 404.00; 363.02;<br>349.97 | C00015 |
| Salidroside                          | 301.0342 | 8.2404  | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>                                | 251.13; 247.09;<br>192.06 | C06046 |
| Gibberellin44                        | 365.276  | 12.7363 | C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>                                | 330.17; 304.19;<br>287.20 | C06095 |
| Trans-zeatin riboside diphosphate    | 512.1494 | 0.869   | C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>11</sub> P <sub>2</sub> | 407.00; 405.02;<br>380.05 | C16429 |
| N.N-dihydroxy-L-tyrosine             | 214.0597 | 0.8551  | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>                                | 196.05; 195.06;<br>165.06 | C15503 |
| Threhalose 6-phosphate               | 423.1802 | 4.6392  | C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> O <sub>14</sub> P                             | 387.07; 355.03;<br>333.05 | C02591 |
| 3-hydroxy-L-kynurenine               | 225.0156 | 1.0926  | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>                 | 208.05; 175.05;<br>135.02 | C00328 |
| 4-hydroxybutyl glucosinolate         | 390.0893 | 10.2047 | C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>10</sub> S <sub>2</sub>               | 358.05; 357.01;<br>291.08 | C08419 |
| 4'-phosphopantetheine                | 358.1849 | 0.8634  | C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> PS              | 342.06; 328.08;<br>291.11 | C01134 |
| Isopentenyladenosine-5'-triphosphate | 492.2099 | 4.6639  | C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> | 501.97; 360.04;<br>358.04 | C16426 |
| Secoisolariciresinol monoglucoside   | 525.1596 | 6.2147  | C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>                               | 523.21; 475.14;           |        |
| Gibberellin A8-catabolite            | 363.1025 | 3.9016  | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>                                | 347.10; 262.05;<br>148.01 | C11870 |
| 8-oxo-Dgmp                           | 378.0237 | 1.3593  | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> P               | 325.02; 316.97;<br>306.02 | C19968 |
| 4-hydroxyglucobrassicin              | 463.1347 | 7.9625  | C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> | 433.08; 427.02;<br>412.03 | C08422 |
| Scoparone                            | 207.0053 | 1.049   | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>                                | 191.04; 173.98;<br>173.03 | C09311 |
| D-galacturonate-1-phosphate          | 275.0524 | 1.065   | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>10</sub> P                              | 238.98; 208.00;<br>201.95 | C04037 |
| Uridine 5'-triphosphate              | 485.0448 | 1.0833  | C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>15</sub> P <sub>3</sub>  | 394.92; 357.03;<br>308.03 | C00075 |
| Malonyldaidzin                       | 503.058  | 1.0495  | C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>                               | 484.10; 355.06;<br>231.04 | C16191 |

|                                            |          |         |                                                                               |                           |        |
|--------------------------------------------|----------|---------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------|
| Xylogalacturonan                           | 735.1143 | 8.1956  | C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>24</sub>                               | 720.16; 633.14;<br>509.07 |        |
| Trans-zeatin riboside triphosphate         | 589.0564 | 8.6184  | C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub> P <sub>3</sub> | 527.03; 518.97;<br>481.95 | C16428 |
| Dihydroxyacetone phosphate                 | 170.0449 | 1.2128  | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> P                                | 153.00; 139.97;<br>138.98 | C00111 |
| 6-methylthiohexyl glucosinolate            | 448.1679 | 0.9011  | C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>9</sub> S <sub>3</sub>                | 383.06; 381.07;<br>367.06 | C17250 |
| Isocorypalmine                             | 342.3715 | 11.6758 | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>                               | 326.14; 298.10;<br>288.14 | C04118 |
| 5-amino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)uracil | 353.0768 | 12.2432 | C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> P                | 319.02; 285.01;<br>279.03 | C01268 |
| GDP-D-glucose                              | 603.0753 | 9.5274  | C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>16</sub> P <sub>2</sub> | 603.07; 544.04;<br>378.98 | C00394 |
| Guanine                                    | 152.981  | 0.6257  | C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O                                | 151.04; 135.02;<br>119.04 | C00242 |
| Proclavamate                               | 203.0515 | 0.9609  | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>                  | 185.07; 184.06;<br>156.06 | C06658 |
| Cytidine 5'-monophosphate                  | 324.0164 | 0.9871  | C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> P                | 306.05; 291.04;<br>289.02 | C00055 |
| Coproporphyrinogen III                     | 661.0285 | 6.0581  | C <sub>36</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>                 | 525.28; 306.13;<br>255.11 | C03263 |
| Oroxindin                                  | 461.1796 | 8.6667  | C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>                               | 381.09; 365.04;<br>355.04 |        |
| D-gluconic acid                            | 196.9606 | 1.0363  | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>                                 | 167.05; 165.04;<br>148.04 | C00257 |
| Mannose 6-phosphate                        | 261.0376 | 1.0491  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> P                               | 207.00; 183.00;<br>177.04 | C00275 |
| Diaminoheptanedioate                       | 291.1306 | 0.8733  | C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>                 | 291.11; 273.07;<br>228.10 | C04421 |
| L-dopa                                     | 197.9616 | 1.8287  | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>                                | 179.03; 124.04;<br>123.03 | C00355 |
| Hordatine A                                | 553.3212 | 7.939   | C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> N <sub>8</sub> O <sub>4</sub>                 | 463.22; 321.10;<br>319.12 | C08307 |
| 1,2-di-O-sinapoyl-β-D-glucose              | 593.1323 | 3.4223  | C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>                               | 561.16; 383.05;<br>381.04 | C04275 |

#### ***II.2.4. Mapeo de rutas metabólicas***

Para tratar de identificar la implicación del ABA en la regulación del metabolismo secundario se llevó a cabo un análisis de rutas metabólicas “metabolomic pathway analysis” (MetPA). Las 10 rutas que resultaron más alteradas por el tratamiento con ABA aparecen en la tabla II.3, siendo la biosíntesis de zeatinas, metabolismo de riboflavina y metabolismo de pirimidina las más importantes, con  $p < 0.05$  y un impacto  $> 0.2$ .

**Tabla II.3:** Lista de las 10 rutas metabólicas más alteradas por la aplicación de ABA a fruto de calabacín, a lo largo del almacenamiento en frío, generado por MetPA. “Match status” indica el número de metabolitos encontrados en cada ruta. La “ $p$ ” representa el  $p$ -valor calculado del análisis de enriquecimiento, “ $-\log(p)$ ” muestra el logaritmo negativo del  $p$ -valor, y finalmente “Impacto” representa la importancia de cada ruta en el análisis calculado mediante el “pathway topology analysis”.

| Nombre de la ruta                                | Match status | $p$     | $-\log(p)$ | Impacto |
|--------------------------------------------------|--------------|---------|------------|---------|
| Biosíntesis de zeatina                           | 6/21         | 5.78E-4 | 3.238      | 0.336   |
| Metabolismo de riboflavina                       | 3/11         | 0.018   | 1.740      | 0.252   |
| Otros antibióticos                               | 2/6          | 0.037   | 1.423      | 0.5     |
| Metabolismo de pirimidinas                       | 5/38         | 0.050   | 1.303      | 0.225   |
| Ruta de las pentosas fosfato                     | 3/19         | 0.079   | 1.105      | 0.002   |
| Biosíntesis de betalaina                         | 1/3          | 0.153   | 0.814      | 1       |
| Metabolismo del triptófano                       | 3/28         | 0.189   | 0.723      | 0.148   |
| Biosíntesis de alcaloides isoquinolínicos        | 1/6          | 0.283   | 0.547      | 0       |
| Metabolismo de fructosa y manosa                 | 2/20         | 0.294   | 0.532      | 0.202   |
| Fijación de carbono en organismos fotosintéticos | 2/21         | 0.314   | 0.502      | 0.031   |

El análisis MetPA mapeó los metabolitos seleccionados y los presentó gráficamente agrupando según las rutas en los que estaban asociados, presentando dichos datos gráficamente en la figura II.6. Observando las rutas metabólicas asociadas a nuestro análisis no dirigido, en el eje “y” se representa el  $-\log_{10}(p)$ , asociado al  $p$ -valor calculado del análisis de enriquecimiento, y los valores de impacto en el eje “x” (Fig.II.6A). La biosíntesis de zeatina resultó como la ruta más significativamente alterada, presentando además un alto impacto ya que se encontraron seis de sus componentes diferentemente acumulados (Fig.II.6B), además se remarcó el metabolismo de riboflavina como la segunda más importante, debido a que se hallaron tres de sus compuestos finales entre dichos metabolitos seleccionados (Fig.II.6C).

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en el análisis de rutas se cuantificaron los niveles de ABA en el tejido, así como los principales metabolitos de ambas rutas.

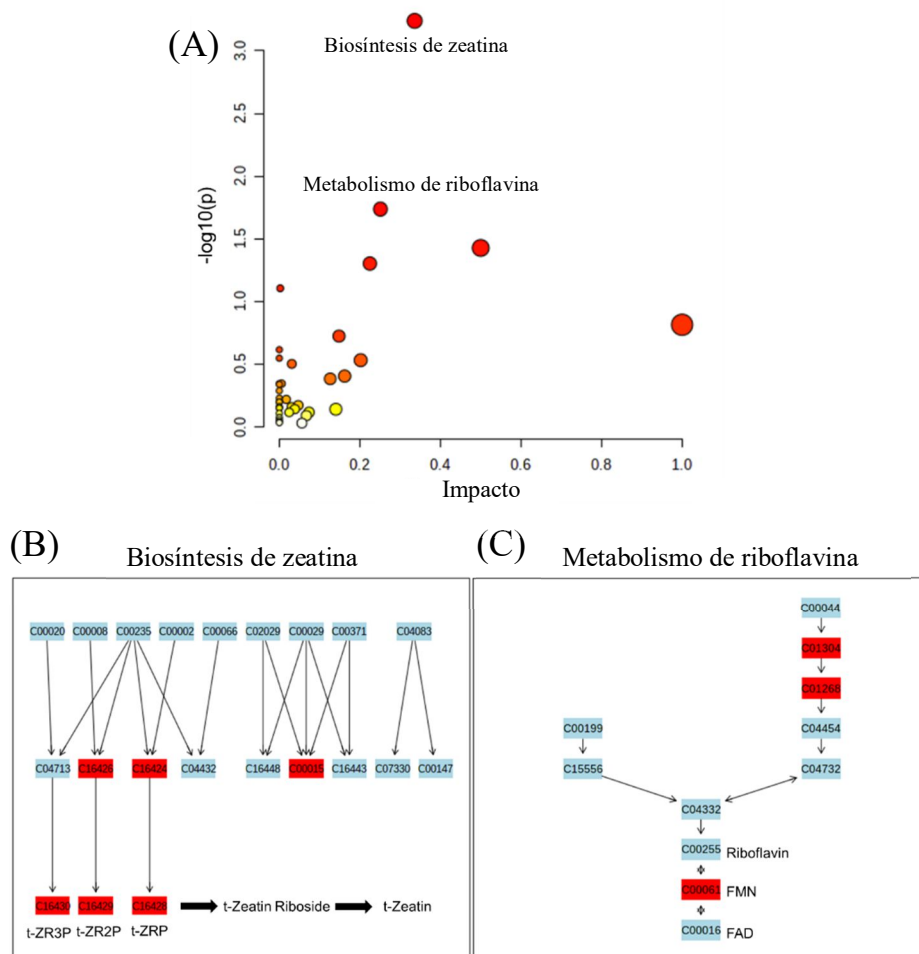


**Fig.II.6:** El análisis de rutas dio como resultado esta visión de las distintas rutas metabólicas que fueron mapeadas a partir de los metabolitos identificados, mostrando diferencias en la modulación significativas. El gráfico A representa el metaboloma, representado con el  $-\log_{10}(p)$  en el eje “y”, y los valores de impacto calculados del pathway topology analysis en el eje “x”. El gradiente de color que rellena cada círculo (rutas) desde blanco hasta rojo oscuro indica desde la intensidad más baja a la más alta. Dos de las rutas más alteradas fueron la de biosíntesis de zeatinas (B) y metabolismo de riboflavina (C), ambas mostrando en rojo algunos de los compuestos identificados en este análisis metabolómico no dirigido.

### II.2.5. Cuantificación de compuestos provenientes del análisis de rutas alteradas por el ácido abscísico

ABA, t-zeatina, t-zeatina ribósido, riboflavina, mononucleótido de flavina (FMN) y dinucleótido de flavina-adenina (FAD) se cuantificaron en los frutos control y tratados con ABA a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento en frío (Fig.II.7 y Fig.II.8).

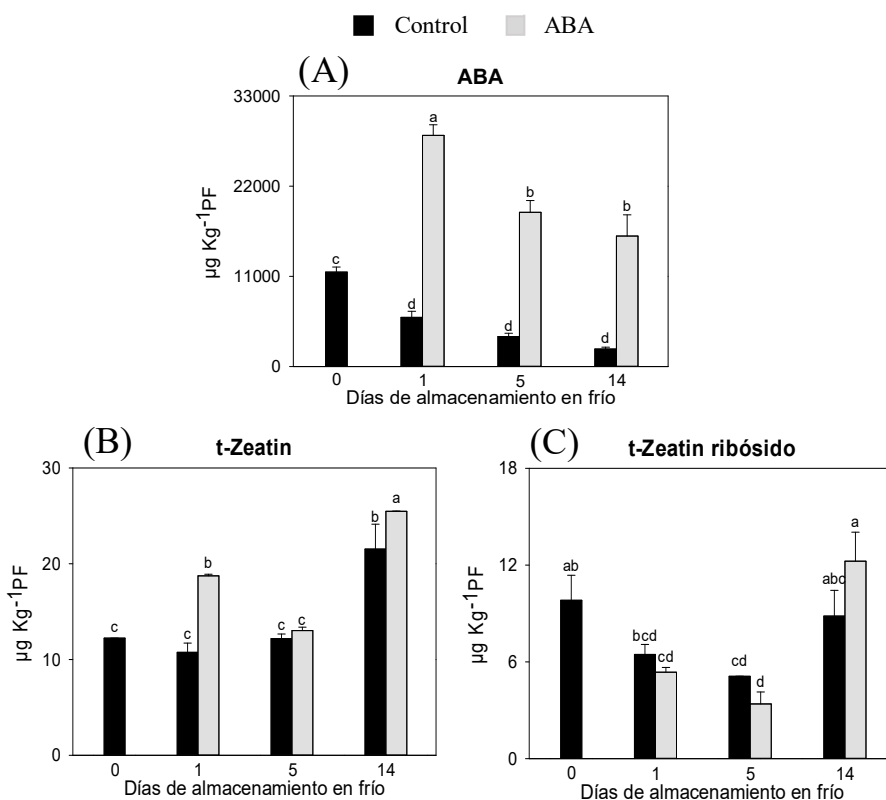


**Fig.II.7:** Determinación del contenido en ABA (A), t-Zeatina (B) y t-Zeatina ribósido (C), en el exocarpo de frutos control y tratados con ABA tras 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento en frío. Los datos mostrados son medias  $\pm$  ES de tres réplicas biológicas con seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

La aplicación de ABA incrementó los niveles endógenos de esta fitohormona en el exocarpo de los frutos tratados, observando las mayores diferencias a 1 día de almacenamiento en frío (Fig.II.7A). En ese tiempo de almacenamiento, tanto t-zeatina como riboflavina incrementaron su contenido

con la aplicación de ABA, llegando ambos compuestos casi a duplicar su contenido respecto a los frutos control (Fig.II.7B y II.8A). Además, los frutos tratados con ABA mostraron un mayor contenido en riboflavina también a 5 días de frigoconservación (Fig.II.8A).

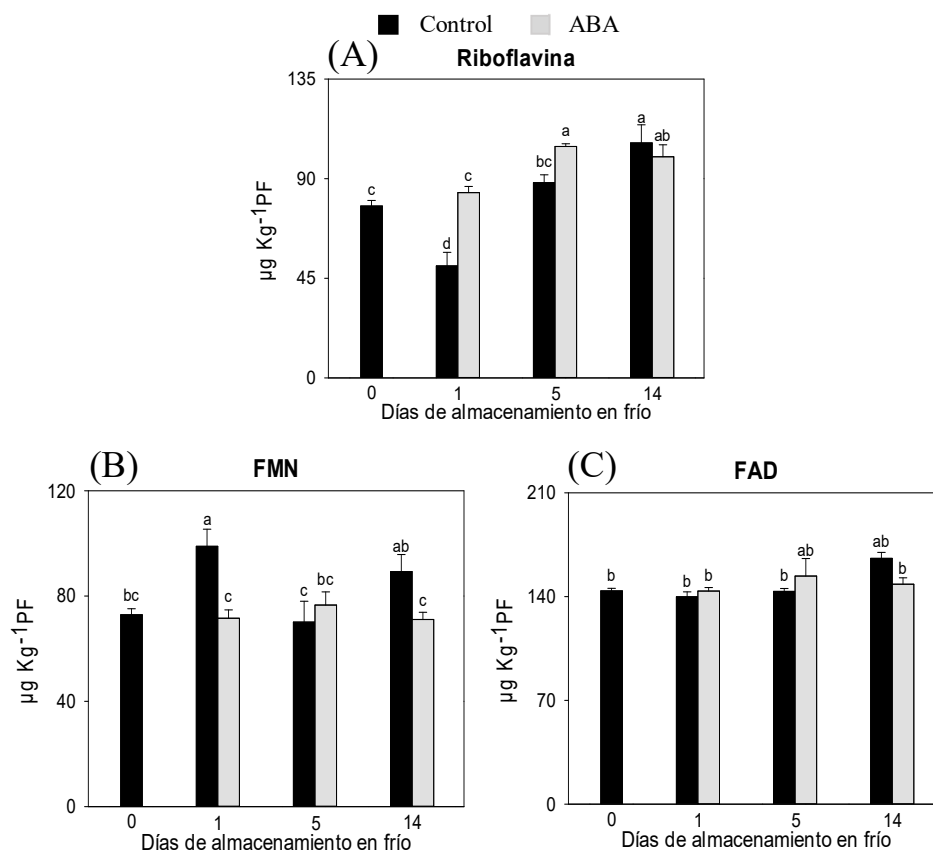


**Fig.II.8:** Determinación del contenido en riboflavina (A), mononucleótido de flavina (FMN) (B) y dinucleótido de flavina-adenina (FAD) (C), en el exocarpo de frutos control y tratados con ABA tras 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento en frío. Los datos mostrados son medias  $\pm$  ES de tres réplicas biológicas con seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, el tratamiento con ABA disminuyó el contenido en teanina ribósido a 1 y 5 días de almacenamiento en frío, comparado con los frutos recién cosechados, mientras que a día 1 no hubo diferencias significativas entre el control y los recién cosechados (Fig.II.7C).

Los resultados obtenidos mostraron un aumento en el contenido en FMN en los frutos control tras 1 día de almacenamiento en frío, respecto a los recién cosechados, no viéndose este incremento en los tratados con ABA para ese mismo periodo de almacenamiento (Fig.II.8B). Por último, en el caso de FAD, no se encontraron diferencias significativas durante el tiempo de experimentación entre frutos control y tratados con ABA (Fig.II.8C).

## **II.3 Discusión**

La importancia de la fitohormona ABA en la regulación del estrés por frío en calabacín se ha demostrado mediante comparativa de dos variedades con diferente tolerancia al frío (Carvajal et al., 2017). De hecho, se ha podido observar en este trabajo una clara inducción de esta tolerancia en pérdida de peso, daños por frío y firmeza (Tabla II.1) añadiendo ABA a una variedad de calabacín cuyos frutos son sensibles al estrés por frío.

Análisis metabolómicos dirigidos y no dirigidos se han llevado a cabo para conocer el comportamiento postcosecha de diferentes frutos como mora (Kim et al., 2019), banana (Yuan et al., 2017), y algunas cucurbitáceas como calabaza (Huang et al., 2019) o calabacín (Abreu et al., 2018). El ABA es una molécula clave para la tolerancia al frío en el fruto de calabacín, por lo que comprender los cambios metabólicos inducidos por esta fitohormona durante el periodo postcosecha podría contribuir a seleccionar marcadores para la tolerancia al estrés por frío en *C. pepo*. Por ello, en este trabajo se han llevado a cabo un análisis del metabolismo primario polar y un análisis no dirigido con el objetivo de elucidar el papel que desempeña el ABA en la regulación de las rutas metabólicas involucradas en la tolerancia al frío del fruto de calabacín.

El análisis del metabolismo primario reveló que la aplicación de ABA indujo importantes cambios metabólicos en el fruto durante los primeros días de almacenamiento, como señaló el análisis PCA (Fig.II.1). Sin embargo, no se encontraron diferencias en metabolitos primarios tras 14 días de almacenamiento en frío. Estos resultados indican que los mecanismos de defensa inducidos por el ABA tienen lugar durante las primeras etapas de almacenamiento.

Se ha descrito que la acumulación de aminoácidos es un importante mecanismo de defensa frente a condiciones de estrés, especialmente durante el manejo postcosecha del fruto (Bang et al., 2019; Brizzolara et al., 2018). En este trabajo, se encontró a través de un análisis PLS-DA un importante número

de aminoácidos relacionados con una menor incidencia de los daños por frío y la aplicación de ABA (Fig.II.2). Se ha descrito una acumulación de histidina en plantas expuestas a cadmio y estrés por sequía, jugando un papel clave en la reducción del daño oxidativo y el mantenimiento de la integridad de membrana (Khan et al., 2019; Zemanová et al., 2014). Los frutos de calabacín tratados con ABA presentaron niveles de este aminoácido significativamente más altos a lo largo del almacenamiento en frío, por lo que la histidina podría jugar un papel similar en la adaptación del fruto a las bajas temperaturas. Otro aminoácido relevante en nuestro estudio es la serina, cuyo contenido se incrementó en los frutos tratados con ABA drásticamente tras la exposición al frío. La serina está involucrada en la adaptación a diferentes condiciones de estrés, incluyendo bajas temperaturas (Watanabe et al., 2021). La fenilalanina, es precursora de la ruta de fenilpropanoides (Barros et al., 2016; Kumar Patel et al., 2023), por lo que podría estar implicada en un incremento en la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos, colaborando con el sistema de defensa antioxidante frente a daños por frío en fruto de calabacín (Castro-Cegri et al., 2023c).

Estudios previos han señalado la importancia de la ruta GABA shunt en la adquisición de tolerancia al frío en fruto de calabacín. Las variedades más resistentes, así como frutos con tolerancia al frío inducida mediante tratamientos físicos como el preacondicionamiento térmico, o químicos como la aplicación de putrescina o GABA, presentaron una inducción de esta ruta (Carvajal et al., 2015a; Palma et al., 2014a, 2015, 2019a). En los primeros días de almacenamiento en frío los frutos tratados con ABA mostraron mayores niveles de GABA que los control, disminuyendo dicho contenido al final del periodo de almacenamiento a 4 °C. Además, se detectaron también unos niveles de ácido glutámico significativamente mayores en los frutos tratados con la fitohormona. Una inducción de la biosíntesis de estos aminoácidos podría suponer una mayor disponibilidad para ser metabolizados en la ruta GABA-shunt, con el objetivo de generar ácido succínico, componente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) generador de energía y poder reductor. De hecho,

el succínico mostró un aumento en los frutos tratados con ABA respecto a los frutos control durante el almacenamiento en frío. Se ha descrito que, en fruto de calabacín, una inducción de la ruta GABA-shunt provee de intermediarios para el ciclo TCA, y por lo tanto, incrementa los contenidos en ATP y NADH en calabacín (Palma et al., 2019), diferentes tratamientos que alivian los daños por frío también se ha descrito que incrementan el contenido en ATP, en frutos como melocotón (Hu et al., 2023; Wang et al., 2023).

Los azúcares solubles juegan un papel fundamental en las respuestas a estrés, actuando como solutos compatibles frente a procesos de estrés osmótico (Rathinasabapathi, 2000). En una variedad de calabacín tolerante al frío se detectó un incremento en el contenido en azúcares tras un periodo de frigoconservación (Palma et al., 2014b). El principal azúcar detectado en los frutos tratados con ABA es la maltotriosa, azúcar que en plantas de *Arabidopsis* participa en la adaptación a estrés por frío (Kaplan and Guy, 2005).

Por lo tanto, el ABA es capaz de modificar el metabolismo primario del fruto, lo que podría inducir las rutas de defensa frente al estrés por frío durante el periodo postcosecha en calabacín. Además, para tener una visión más profunda de esta respuesta, se llevó a cabo un análisis metabolómico no dirigido (MetPA) con el objetivo de buscar metabolitos secundarios involucrados en la tolerancia al frío inducida por ABA.

El análisis MetPA señaló a la biosíntesis de zeatinas y al metabolismo de riboflavina como las principales rutas inducidas por el ABA (Fig.II.6), por lo que los metabolitos más representativos de ambas rutas fueron cuantificados con el objetivo de conocer el efecto del ABA y el almacenamiento en frío en ambas rutas metabólicas. La aplicación de ABA indujo la acumulación endógena de esta fitohormona principalmente en el exocarpo del fruto de calabacín a las 24 horas, provocando también un aumento tanto en t-zeatina como en riboflavina, los dos metabolitos principales de las rutas identificadas (Figs.II.8 y II.9). Previamente se ha descrito la importancia de los cambios que

ocurren en las primeras 24 horas de exposición al frío para inducir los mecanismos de defensa del fruto de calabacín, permitiendo mantener la calidad del fruto durante el periodo postcosecha (Carvajal et al., 2017; Castro-Cegri et al., 2023c; Palma et al., 2015, 2019). De hecho, Carvajal et al. (2021) describieron una inducción en genes responsables de la síntesis de ceras también a 1 día de almacenamiento en frío en una variedad de calabacín tolerante al frío, mostrando además esta variedad un alto contenido en ABA durante los primeros días de almacenamiento (Carvajal et al., 2017). Recientemente, se ha descrito también el papel que juega el ABA en la integridad de la cutícula, regulando una mayor acumulación de citoquininas en cerezas (Gutiérrez et al., 2021). Dichos resultados son similares a los encontrados en nuestro experimento, donde la aplicación de ABA indujo la acumulación de t-zeatina tras 1 día de estrés por frío. Por ello, esta respuesta del ABA a las bajas temperaturas podría estar mediada por un incremento de la ruta de biosíntesis de zeatinas, responsable de cambios en la composición de la cutícula del fruto de calabacín que podrían mantener la calidad del fruto durante el almacenamiento en frío.

Por otro lado, también se observó una mayor acumulación de riboflavina en los frutos tratados con ABA respecto al control en los primeros días de almacenamiento en frío, siendo más importante este aumento a 1 día de almacenamiento, reduciéndose esta diferencia tras 5 días y no mostrando diferencias al final del periodo de almacenamiento. Por el contrario, los frutos control mostraron un mayor contenido en FMN que los tratados con ABA, también a día 1 a 4 °C. Riboflavina (vitamina B2) es el principal producto de la ruta de biosíntesis de riboflavina y actúa como un compuesto antioxidante natural en los tejidos vegetales (Fischer and Bacher, 2006). Esta vitamina es la precursora de FAD y FMN, cofactores esenciales en una amplia variedad de procesos metabólicos en las plantas (Sandoval et al., 2008). La riboflavina está implicada en la tolerancia a la sequía (Deng et al., 2014), la mejora de la calidad del fruto (Pérez-Álvarez et al., 2019) y actúa previniendo el pardeamiento (Zha

et al., 2022). Los mecanismos responsables de estos procesos involucran la regulación mediada por riboflavina de ROS y el sistema antioxidante endógeno (Li et al., 2012). Se ha descrito que un tratamiento con riboflavina fortalece el sistema antioxidante evitando la peroxidación de las membranas en manzanas durante 8 días de almacenamiento a 4 °C (Zha et al., 2022). La aplicación de riboflavina también mostró una tendencia a incrementar la concentración de aminoácidos en uva (Pérez-Álvarez et al., 2019), y a regular positivamente los genes que codifican para la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), activando la ruta fenilpropanoides (Taheri and Tarighi, 2011). Castro-Cegri et al., 2022c han propuesto una inducción de la ruta fenilpropanoides por el tratamiento con ABA en el fruto de calabacín, por ello dicha respuesta podría estar regulada por la acumulación de riboflavina inducida por la fitohormona. Además, se ha demostrado que una acumulación de compuestos fenólicos causa fortificación de la pared celular (Taheri and Tarighi, 2010), que podría ser también importante para la tolerancia al frío en calabacín. En maíz, una mutación en una pirimidina reductasa, involucrada en la síntesis de riboflavina, produjo plantas con menor contenido en riboflavina, pero también con un menor contenido en ABA (Dai et al., 2019). Teniendo en cuenta esta información en conjunto se ha propuesto un modelo teórico sobre la inducción de la síntesis de citoquininas y riboflavina mediada por ABA, y su implicación con las ROS y ruta de fenilpropanoides (Fig.II.9).

En resumen, el tratamiento con ABA incrementa la tolerancia al frío del fruto de calabacín. Esta fitohormona modula el metabolismo primario, induciendo la acumulación de aminoácidos clave en la tolerancia al frío, y además altera importantes rutas del metabolismo secundario, dando lugar a un incremento en t-zeatina y riboflavina en los primeros días de almacenamiento en frío, lo que apoya el efecto protector del ABA frente al estrés por frío a corto plazo.

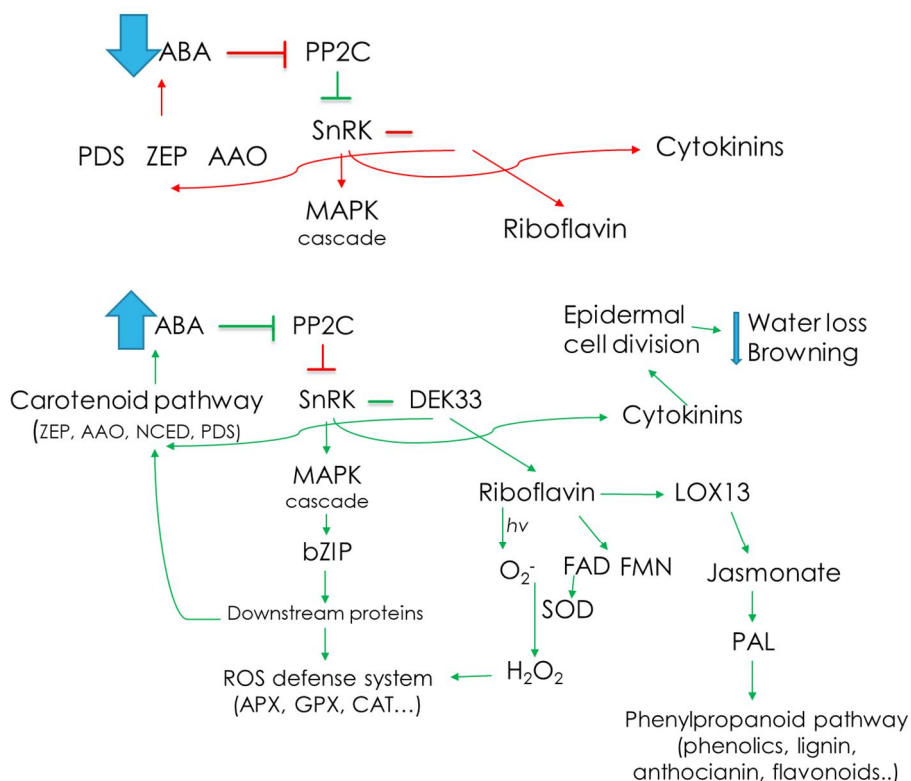


**Fig.II.9:** Modelo propuesto para el mecanismo de regulación de la tolerancia al frío mediado por ácido abscísico (ABA), estando bloqueadas determinadas vías (rojo) a bajas concentraciones de esta hormona, y que al inducirse una mayor concentración de ABA se activan (verde), dando lugar a una inducción en la defensa frente al estrés por frío.



### **Capítulo III. Regulación del metabolismo fenólico y el sistema antioxidante no enzimático en fruto de calabacín mediante la aplicación de ácido abscísico durante la frigoconservación**

*Castro-Cegri, A., Sierra, S., Hidalgo-Santiago, L., Esteban-Muñoz, A., Jamilena, M., Garrido, D., Palma, F. (2023). Postharvest treatment with abscisic acid alleviates chilling injury in zucchini fruit by regulating phenolic metabolism and non-enzymatic antioxidant system.*

*Antioxidants 12, 211.*



### **III.1 Introducción**

El almacenamiento de algunos frutos a bajas temperaturas incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), induciendo un estrés oxidativo cuando este incremento excede la capacidad del tejido de eliminarlas, dando lugar a daño celular, y en el fruto de calabacín, a los denominados daños por frío (Parvin et al., 2019; Valenzuela et al., 2017). Los mecanismos de defensa antioxidante en la célula vegetal se componen, de sistemas enzimáticos, entre ellos las enzimas SOD, CAT y POD, y las pertenecientes al ciclo de Halliwell-Asada (Avashthi et al., 2018; Li et al., 2022), y por otra parte de antioxidantes no enzimáticos, como son el tocoferol, carotenoides, ascorbato, glutatión y compuestos fenólicos (Buran et al., 2012; Díaz-Mula et al., 2009; Diretto et al., 2020; Yao et al., 2021). Se ha demostrado que el ABA es una molécula importante para la tolerancia de estrés abiótico en diferentes especies de plantas, debido a que incrementa la defensa antioxidante en los tejidos diana (Iqbal et al., 2022; Parveen et al., 2021). ABA es uno de los productos de la ruta metabólica de los carotenoides, de hecho, se ha descrito en células vegetales un aumento en la acumulación de carotenoides tras el tratamiento con ABA (Y. Liu et al., 2020), siendo estos pigmentos naturales unos importantes componentes en la defensa antioxidante no enzimática. La aplicación de ABA también incrementa la capacidad antioxidante en fruto debido a una regulación positiva de ascorbato y de la ruta de fenilpropanoides (Li et al., 2014; Mattus-Araya et al., 2022; Miret and Munné-Bosch, 2016; Sala et al., 2005; Tao et al., 2020). En diversos frutos se ha descrito que la aplicación de jasmonatos reduce los daños por frío, manteniendo la calidad postcosecha debido en parte a la inducción de la ruta de fenilpropanoides, acumulándose compuestos fenólicos que actúan en el sistema de defensa (Dhami et al., 2023; Pan et al., 2020).

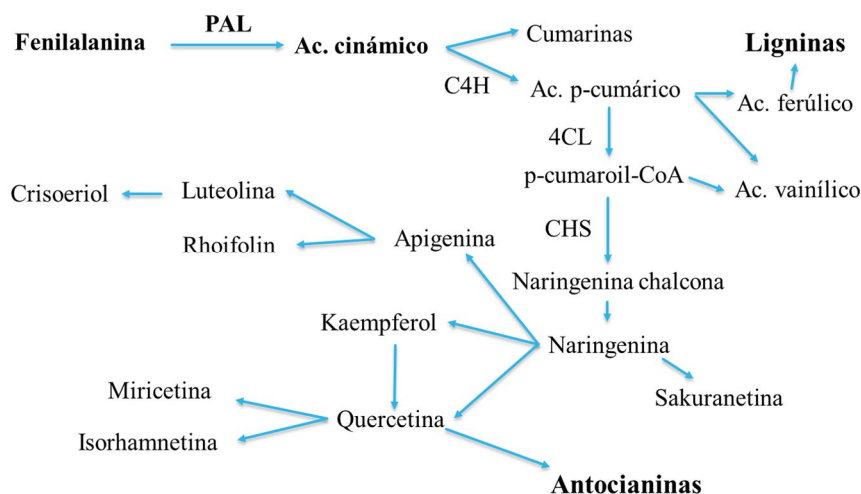


**Fig.III.1:** Esquema simplificado de la ruta de fenilpropanoides.

Las enzimas lipooxigenasas (LOX) tienen capacidad para incrementar el contenido en ambas hormonas, ya que además de inducir la acumulación de jasmonatos, en presencia de algunos ácidos grasos como el linoleico, pueden causar una inducción de la ruta de biosíntesis de carotenoides, lo que provocaría un aumento en la síntesis del ABA (Kondo et al., 2000; Parry and Horgan, 1991). De esta manera, un incremento en los mecanismos antioxidantes, mediados por ABA, podría ser responsable de la reducción de daños por frío en fruto de calabacín. El objetivo fue estudiar el efecto de la aplicación de ABA sobre los principales antioxidantes no enzimáticos, profundizando en el metabolismo fenólico, y su relación con la inducción de la tolerancia al frío en fruto de calabacín durante su almacenamiento postcosecha.

## III.2 Resultados

### III.2.1. Efecto del ABA en antioxidantes no enzimáticos

Con el objetivo de llevar a cabo una evaluación de la capacidad antioxidante del exocarpo del fruto se realizaron los ensayos TEAC, DPPH y FRAP, así como también se determinó el contenido en ascorbato, a lo largo del periodo de almacenamiento en frío del fruto de calabacín en los frutos control y tratados con ABA (Fig.III.2).

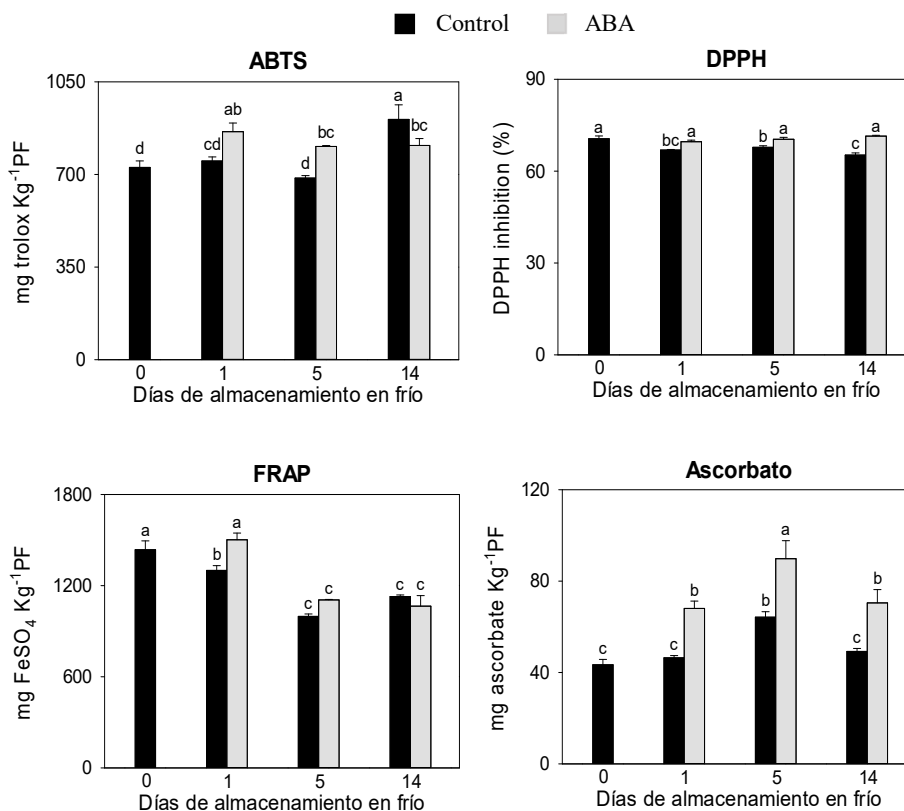


**Fig.III.2.** Evaluación de cambios en capacidad antioxidante por los ensayos ABTS, DPPH y FRAP, así como por contenido en ascorbato, en exocarpo de frutos control y tratados con ABA (0.5 mM), a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento a 4 °C. Los datos presentados son medias de tres réplicas biológicas, de seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras en cada periodo de almacenamiento para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la capacidad antioxidante del fruto de calabacín debido a la aplicación de ABA,

especialmente al inicio del almacenamiento en frío, en todos los test antioxidantes realizados se observó un aumento significativo con el tratamiento hormonal respecto al fruto control (Fig.III.2). A partir de 5 días de frigoconservación sólo en los test ABTS y DPPH se detectan diferencias significativas. En cuanto al contenido en ascorbato se detectó una clara inducción debido a la aplicación de ABA, incrementando alrededor de un 40% la cantidad de este metabolito, desde el primer día hasta el final del almacenamiento en frío (Fig.III.2). Para comprobar cómo el ABA modula la acumulación de diferentes carotenoides, se cuantificaron el contenido en las xantofilas luteína y zeaxantina, así como en los carotenos alfa-caroteno y beta-caroteno (Fig.III.3).

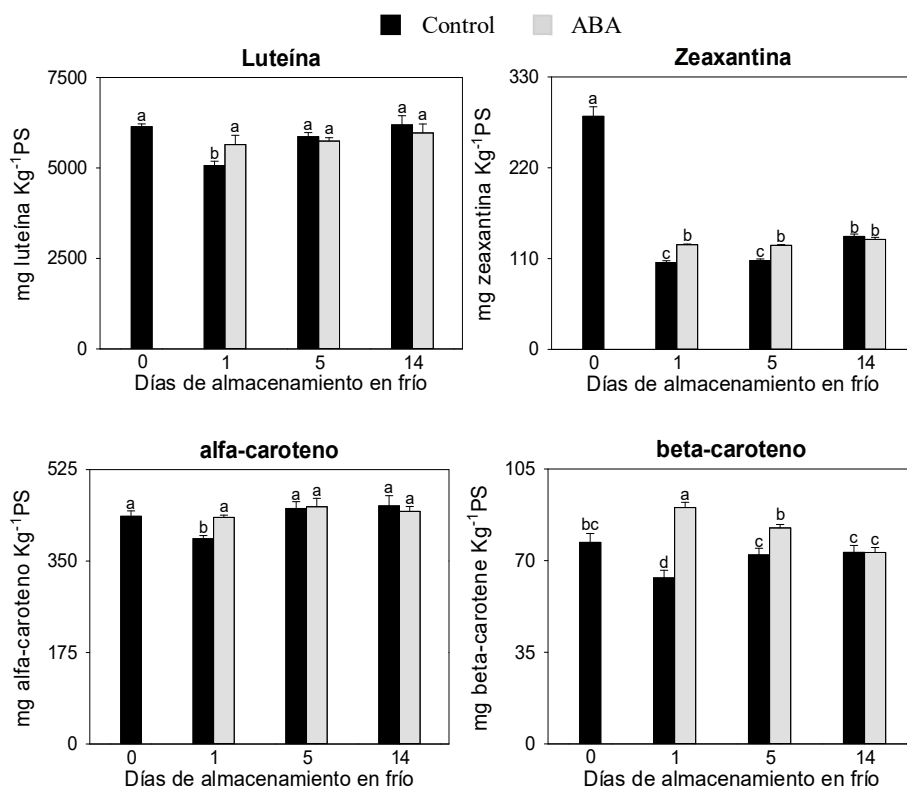


**Fig.III.3.** Determinación del contenido de luteína, zeaxantina, alfa-caroteno y beta-caroteno, en exocarpo de frutos control y tratados con ABA (0.5 mM), a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento a 4 °C. Los datos presentados son medias de tres réplicas biológicas, de seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras en cada periodo de almacenamiento para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

En los frutos control, los cuatro carotenoides medidos disminuyeron su concentración el primer día de almacenamiento en frío respecto a los frutos recién cosechados, siendo más acusado este descenso para la zeaxantina y el beta-caroteno, con una reducción de 63 y 18 % respectivamente. Sin embargo, los niveles de luteína, alfa-caroteno y beta-caroteno en frutos tratados con ABA no disminuyeron respecto a los frutos recién cosechados durante todo el periodo de almacenamiento. En el caso de zeaxantina sí que se produjo esa reducción al inicio del almacenamiento, pero el ABA consiguió que los niveles de este compuesto se mantuvieran más altos que los de los frutos control a 1 y 5 días de almacenamiento en frío. El cambio más significativo se produjo en beta-caroteno, con un gran incremento en el primer día de frigoconservación en los frutos tratados con ABA, mostrando un aumento de 42% respecto a los frutos control (Fig.III.3).

### ***III.2.2. Implicación del ABA en la ruta de los fenilpropanoides***

Para explorar la influencia del ABA en las primeras etapas de la biosíntesis de compuestos fenólicos en fruto de calabacín durante la postcosecha, se ha determinado el contenido en fenilalanina y la actividad enzimática fenilalanina amonio liasa (PAL), así como los productos finales en forma de fenoles solubles totales y contenido en flavonoides totales.

En la figura III.4 se observa un incremento en el contenido de fenilalanina debido al estrés por frío a lo largo del periodo de almacenamiento, siendo mayor el incremento en este aminoácido en aquellos frutos tratados con ABA, tras 1 y 5 días de frigoconservación respecto a los frutos control. Por otro lado, la actividad PAL, principal enzima responsable de la ruta de los fenilpropanoides, aumentó su actividad por el tratamiento con ABA a las 24 horas de almacenamiento a 4 °C, comparado con los frutos control, mientras que no se detectan diferencias significativas tras 5 y 14 días de almacenamiento (Fig.III.4).

Similar respuesta se observó para el contenido en fenoles y flavonoides totales, detectándose un incremento significativo de alrededor del 30% y del 10%, respectivamente, debido a la aplicación de ABA respecto a los frutos control después de 1 día de almacenamiento en frío. Igual que ocurría para la enzima PAL, a 5 y 14 días de frigoconservación no se encuentran diferencias significativas entre frutos control y tratados (Fig.III.4).

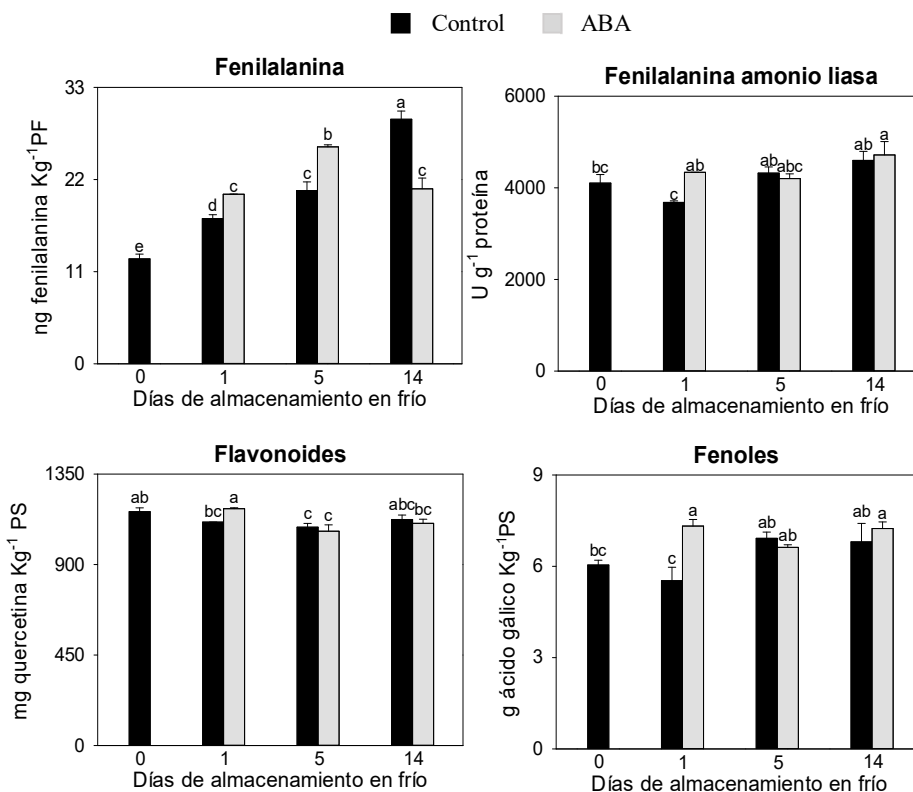


**Fig.III.4.** Evaluación de la ruta fenilpropanoides, mediante determinación del contenido en fenilalanina y actividad fenilalanina amonio liasa, así como cuantificación del contenido en flavonoides y fenoles totales en exocarpo de frutos control y tratados con ABA (0.5 mM), a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento a 4 °C. Los datos presentados son medias de tres réplicas biológicas, de seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras en cada periodo de almacenamiento para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

### III.2.3. Papel del ABA modulando enzimas oxidantes de fenoles

El almacenamiento en frío incrementó la actividad PPO en los frutos control, mostrando el valor máximo tras 5 días de almacenamiento en frío, con un aumento del 300% comparado con los frutos recién cosechados (Fig.III.5). Por el contrario, en los frutos tratados con la fitohormona la actividad de esta enzima se mantuvo a unos niveles similares a la de los frutos recién cosechados tanto a 1 como a 14 días a 4 °C, y mostrando una importante reducción a 5 días respecto a frutos control (Fig.III.5).

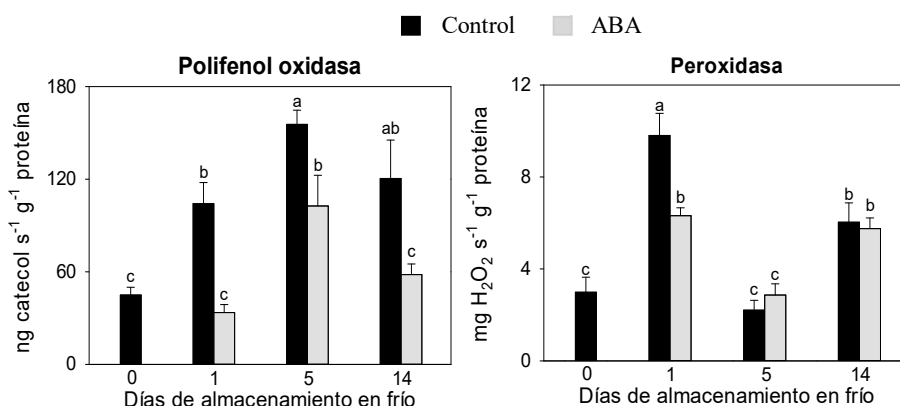


**Fig.III.5.** Determinación de la actividad polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) en exocarpo de frutos control y tratados con ABA (0.5 mM), a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento a 4 °C. Los datos presentados son medias de tres réplicas biológicas, de seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras en cada periodo de almacenamiento para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

Para la actividad POD los cambios más importantes ocurrieron al inicio del almacenamiento en frío, coincidiendo con los mayores contenidos en ABA endógeno, donde los frutos control mostraron el triple de actividad que los frutos recién cosechados, mientras que en los tratados con ABA este incremento fue significativamente menor, dando lugar a unos niveles de actividad un 35% inferior a los del control tras 1 día de almacenamiento a 4 °C (Fig.III.5). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas debido al tratamiento con ABA durante el resto del periodo de almacenamiento estudiado.

#### ***III.2.4. Efecto del ABA sobre la síntesis de fenoles***

Con el objetivo de conocer más en profundidad la implicación del ABA en el metabolismo fenólico del fruto de calabacín, se realizó una cuantificación de algunos de los compuestos fenólicos más representativos en la ruta de los fenilpropanoides: ácidos hidroxibenzoicos (vainílico, elágico), hidroxicinámicos (ferúlico, *p*-coumárico), y flavonoides (quercetina, isorhamnetina, miricetina, naringenina, luteolina, rhoifolina y crisoeiriol).

En este estudio, el vainílico fue el compuesto hidroxibenzoico más afectado por el tratamiento con ABA, aumentando sus niveles un 35 y 25 % comparado con los frutos control a 5 y 14 días de almacenamiento, respectivamente, y manteniendo en los frutos tratados el contenido en este compuesto fenólico igual que el de los frutos recién cosechados a los 5 y 14 días a 4 °C (Tabla III.1). Por otro lado, el contenido en ácido elágico se aumentó durante el periodo de almacenamiento debido al estrés por frío, pero sin mostrar diferencias significativas por el tratamiento con ABA.

Una tendencia similar a la del vainílico se observó en el caso de los ácidos hidroxicinámicos (Tabla III.1). Tanto el ácido ferúlico como el *p*-coumárico mostraron una mayor acumulación tras 5 días de almacenamiento en los frutos tratados con ABA comparados con control, siendo el ferúlico el principal ácido hidroxicinámico detectado.

Siete compuestos flavonoides diferentes se cuantificaron para dilucidar el efecto del almacenamiento en frío y la aplicación de ABA en calabacín (Tabla III.2). Quercetina fue el flavonoide mayoritario, alcanzando niveles cercanos a los 200 mg/KgPS en fruto recién cosechado. El estrés por frío dio lugar a una importante reducción de quercetina en los frutos control, mientras que los tratados con ABA mostraron una mayor producción, presentando las mayores diferencias en el primer día de almacenamiento en frío, con un aumento de un 41% respecto al control, lo que permitió que los frutos tratados con ABA pudieran mantener unas concentraciones de quercetina similares a los

**Tabla III.1.** Ácidos hidroxibenzoicos (vainílico y elágico) e hidroxicinámicos (ferúlico y cumárico) cuantificados durante el periodo de almacenamiento a 4 °C (0, 1, 5 y 14 días) en frutos control y tratados con ABA (0.5 mM).

| Días en frío                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |           | 0                       | 1                      |                       | 5                     |                         | 14                    |                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |           |                         | Control                | ABA                   | Control               | ABA                     | Control               | ABA                     |
| <b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           |                         |                        |                       |                       |                         |                       |                         |
| <b>Vainílico</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | (mg/KgPS) | 27.3±2.4 <sup>Aab</sup> | 22.8±1.5 <sup>AB</sup> | 22.5±0.6 <sup>b</sup> | 20.4±0.3 <sup>B</sup> | 27.9±1.4 <sup>a*</sup>  | 20.7±0.2 <sup>B</sup> | 25.8±1.4 <sup>ab*</sup> |
| <b>Elágico</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | (μg/KgPS) | 5.7±0.1 <sup>Bb</sup>   | 19.8±0.6 <sup>A</sup>  | 19.8±1 <sup>a</sup>   | 18.6±0.8 <sup>A</sup> | 18.1±0.4 <sup>a</sup>   | 18.7±0.5 <sup>A</sup> | 18.3±0.2 <sup>a</sup>   |
| <b>Ácidos hidroxicinámicos</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           |                         |                        |                       |                       |                         |                       |                         |
| <b>Ferúlico</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | (mg/KgPS) | 8.9±0.4 <sup>Bb</sup>   | 3.6±0.5 <sup>D</sup>   | 3.3±0.2 <sup>c</sup>  | 5.4±0.1 <sup>C</sup>  | 8.7±0.5 <sup>b*</sup>   | 13.3±0.5 <sup>A</sup> | 12.8±0.7 <sup>a</sup>   |
| <b>Cumárico</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | (μg/KgPS) | 21.3±1.4 <sup>Aa</sup>  | 25.2±3.4 <sup>A</sup>  | 25.8±1 <sup>a</sup>   | ND <sup>B</sup>       | 13.5±0.8 <sup>ab*</sup> | ND <sup>B</sup>       | ND <sup>B</sup>         |
| ND: no detectado; Los datos mostrados son medias ± ES de tres réplicas biológicas con seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ). Letras mayúsculas indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento en los frutos control, y letras minúsculas para los tratados con ABA. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre ambos tratamientos para el mismo periodo de almacenamiento. |           |                         |                        |                       |                       |                         |                       |                         |

**Tabla III.2.** Flavonoides (quercetina, isorhamnetina, miricetina, naringenina, luteolina, rhoifolin y crisoeriol) cuantificados durante el periodo de almacenamiento a 4 °C en frío (0, 1, 5 y 14 días) en frutos control y tratados con ABA (0.5 mM).

| Días en frío         |           | 0                        | 1                       |                          | 5                      |                         | 14                     |                          |
|----------------------|-----------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|
|                      |           |                          | Control                 | ABA                      | Control                | ABA                     | Control                | ABA                      |
| Flavonoides          |           |                          |                         |                          |                        |                         |                        |                          |
| <b>Quercetina</b>    | (mg/KgPS) | 187.0±30.6 <sup>Aa</sup> | 147.1±7.9 <sup>AB</sup> | 207.7±13.9 <sup>a*</sup> | 181.5±1.8 <sup>A</sup> | 196.8±3.6 <sup>a*</sup> | 130.2±9.3 <sup>B</sup> | 174.4±18.5 <sup>a*</sup> |
| <b>Isorhamnetina</b> | (µg/KgPS) | 30.5±0.4 <sup>Bc</sup>   | 31.9±0.7 <sup>B</sup>   | 35.6±0.1 <sup>b*</sup>   | 34.2±0.1 <sup>B</sup>  | 40.1±3.7 <sup>ab*</sup> | 46.5±4.9 <sup>A</sup>  | 43.1±1.3 <sup>a</sup>    |
| <b>Miricetina</b>    | (mg/KgPS) | 2.8±0.1 <sup>ABb</sup>   | 2.7±0.1 <sup>AB</sup>   | 3.8±0.1 <sup>a*</sup>    | 3.0±0.1 <sup>A</sup>   | 2.9±0.4 <sup>b</sup>    | 2.3±0.3 <sup>B</sup>   | 2.6±0.1 <sup>b</sup>     |
| <b>Naringenina</b>   | (µg/KgPS) | 10.5±1.4 <sup>Aa</sup>   | 9.4±0.8 <sup>A</sup>    | 10.3±0.8 <sup>a</sup>    | 9.1±0.7 <sup>A</sup>   | 11.0±0.3 <sup>a</sup>   | 9.8±0.8 <sup>A</sup>   | 10.8±0.6 <sup>a</sup>    |
| <b>Luteolina</b>     | (µg/KgPS) | 16.5±0.1 <sup>ABb</sup>  | 20.8±2.0 <sup>A</sup>   | 43.6±1.2 <sup>a*</sup>   | 13.9±1 <sup>B</sup>    | 44.8±6 <sup>a*</sup>    | 12.6±2.3 <sup>B</sup>  | 39.8±6.2 <sup>a*</sup>   |
| <b>Rhoifolin</b>     | (µg/KgPS) | 16.9±0.4 <sup>Aa</sup>   | 8.8±0.4 <sup>B</sup>    | 11.5±1.4 <sup>b</sup>    | 7.8±0.5 <sup>B</sup>   | 11.0±1.1 <sup>*</sup>   | 8.8±3.2 <sup>B</sup>   | 5.6±0.5 <sup>b</sup>     |
| <b>Crisoeriol</b>    | (µg/KgPS) | 24.5±0.3 <sup>Aa</sup>   | 6.4±0.5 <sup>B</sup>    | 10.3±0.2 <sup>b*</sup>   | 4.5±1.5 <sup>B</sup>   | 5.9±1.4 <sup>c</sup>    | 0.3±0.1 <sup>C</sup>   | 4.8±1.4 <sup>c*</sup>    |

Los datos mostrados son medias ± ES de tres réplicas biológicas con seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ). Letras mayúsculas indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento en los frutos control, y letras minúsculas para los tratados con ABA. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre ambos tratamientos para el mismo periodo de almacenamiento.

frutos recién cosechados. Quercetina y luteolina son los compuestos flavonoides que mostraron mayores diferencias entre los frutos control y los tratados con ABA, siendo la luteolina el flavonoide más afectado por el tratamiento, llegando a incrementarse entre 2 y 3 veces su contenido comparado con los frutos control durante todo el periodo de almacenamiento. Por otra parte, isorhamnetina, miricetina, rhoifolin y crisoeriol mostraron importantes incrementos debido al tratamiento con ABA, especialmente a 1 y 5 días de almacenamiento en frío. De todos los flavonoides cuantificados, solo la naringenina no mostró diferencias significativas comparadas a los frutos control.

### **III.3 Discusión**

Este trabajo trata de dilucidar los mecanismos de defensa antioxidante que subyacen a la respuesta del ABA frente al estrés por frío durante el almacenamiento postcosecha.

En una variedad de calabacín resistente al frío se produce un incremento en el contenido de ABA endógeno tras un día de almacenamiento en frío, mientras que dicho incremento no se detecta en una variedad sensible al frío (Carvajal et al., 2017), lo que podría indicar que la resistencia a este estrés se induce en las primeras horas de exposición, siendo clave el desencadenamiento de los mecanismos de tolerancia en dicho momento para conseguir una adaptación más efectiva al frío. Coincidiendo con esta respuesta, en nuestro experimento observamos que los test antioxidantes ABTS, DPPH y FRAP, mostraron diferencias significativas respecto al control al inicio del almacenamiento en frío, con una inducción de la capacidad antioxidante por parte del tratamiento con ABA, lo que provocó que se alargara la vida postcosecha del fruto, manteniendo la calidad tras 14 días de almacenamiento en frío con unos bajos índices de daños por frío, inferiores a los del fruto control, lo que se traduce en una mejor apariencia visual.

Los antioxidantes no enzimáticos juegan un papel fundamental en la defensa frente estreses, de hecho, en el fruto de calabacín se ha visto que diferentes tratamientos que mejoraron la tolerancia al frío también indujeron la acumulación de ascorbato (Carvajal et al., 2015b; Palma et al., 2016). Por ello, el incremento provocado por la aplicación de ABA en esta vitamina en el fruto de calabacín desde el inicio del almacenamiento, y durante todo el periodo postcosecha, podría ser un factor clave en la mejora observada de la tolerancia al estrés por frío. Además, también ha sido demostrado que un alto contenido en ascorbato en otros frutos es responsable de su resistencia a diferentes estreses abióticos, de hecho, en tomate, la sobreexpresión de varios genes involucrados en el aumento de ascorbato dio lugar a frutos mejor adaptados a condiciones de estrés (F. Abdelgawad et al., 2019; Mellidou et al., 2021), y en melocotón, un

tratamiento con aire caliente, que mejoró su resistencia frente a los daños por frío, también incrementó la transcripción de genes relacionados con la producción de ácido ascórbico (Ke et al., 2014). Además, coincidiendo con nuestros resultados, en arándanos y fresa se produce también una acumulación de vitamina C mediada por ABA (Buran et al., 2012; Li et al., 2014).

Otros metabolitos con una gran capacidad antioxidante en frutos son los carotenoides (Díaz-Mula et al., 2009; Panjai et al., 2021; Tavarini et al., 2008). El mecanismo que controla el metabolismo de carotenoides durante la postcosecha es complejo, sin embargo, se ha demostrado que el ABA también afecta a su síntesis y acumulación en tomate (Barickman et al., 2014). En un estudio llevado a cabo en mandarina se reveló una fuerte correlación negativa entre los niveles de carotenoides en la piel en el momento de la cosecha y los índices de daños por frío al final del almacenamiento (Rey et al., 2020). Por ello, mantener el contenido en carotenoides durante el periodo postcosecha parece ser crucial para soportar el estrés por frío en el fruto. En nuestros resultados se observa que el ABA produce esta respuesta en el fruto de calabacín, e incluso en el beta-caroteno, el tratamiento con ABA induce su acumulación en los primeros días de almacenamiento en frío, respuesta que es importante para la tolerancia al frío, ya que se ha demostrado en un estudio con plantas de patata transgénicas que tenían suprimida beta-caroteno hidrolasa, y por lo tanto se acumulaban grandes cantidades de beta-caroteno, que dichas plantas mostraban una tolerancia a estrés abiótico más alta que las plantas de fenotipo salvaje (Kang et al., 2017). En tomates, la sobreexpresión de una licopeno beta-ciclasa en el fruto dio lugar también a niveles incrementados de beta-caroteno, junto con un incremento en ABA, mostrando estos frutos una prolongada vida útil (Diretto et al., 2020).

El metabolismo fenilpropanoide produce metabolitos secundarios en plantas, como son flavonoides y compuestos fenólicos, que son potentes antioxidantes que juegan un papel principal en la defensa frente estreses bióticos y abióticos (Naikoo et al., 2019; L. Wang et al., 2019; D. Zhang et al.,

2021). El primer paso enzimático en la biosíntesis de fenilpropanoides empieza con la deaminación de la fenilalanina por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) hacia ácido cinámico y demás compuestos aguas abajo de la ruta (Barros et al., 2016). Comprender los mecanismos involucrados en la síntesis y acumulación de estos compuestos, es de vital importancia para desarrollar frutos con una mayor resistencia a estreses bióticos y abióticos (Vighi et al., 2019). Varios estudios han descrito el efecto del ABA como un activador de esta ruta, y por lo tanto su papel incrementando el número de compuestos antioxidantes (Tao et al., 2020; Villalobos-González et al., 2016). En estudios previos se ha demostrado que el tratamiento con fenilalanina activa la ruta fenilpropanoides, incrementando la tolerancia al frío en fruto de mango debido a que este tratamiento indujo una acumulación de flavonoides (Kumar Patel et al., 2023). Debido a la capacidad del ABA de inducir la actividad PAL en las primeras horas tras aplicarse la fitohormona, esta respuesta es importante para disparar el mecanismo antioxidante que protege al fruto frente a los daños por frío (Markhart, 1986). En relación a esta respuesta, nosotros observamos en el fruto de calabacín un importante aumento en el contenido en fenilalanina en los primeros días de almacenamiento en frío por la aplicación de ABA, junto con un incremento en la actividad PAL, que podría dar lugar a una activación de la ruta fenilpropanoides, y ser responsable de una mejor adaptación del fruto a condiciones de estrés por frío. De hecho, en frutos de mango, tomate y pepino, tratamientos que incrementan la expresión de PAL y/o la síntesis de fenilalanina también incrementan la biosíntesis de compuestos fenólicos y flavonoides durante la postcosecha (Aghdam et al., 2019; Cao et al., 2009; Kumar Patel et al., 2023).

Para verificar si este incremento en fenilalanina y PAL, inducido por la fitohormona, tuvo un efecto en la ruta fenilpropanoides del fruto de calabacín durante el almacenamiento en frío, se midió el contenido en fenoles solubles totales y flavonoides, observándose un claro incremento en estos compuestos antioxidantes, tras 1 día de almacenamiento en frío en el tratamiento con ABA.

Este incremento en fenoles podría proteger el fruto frente a las especies reactivas del oxígeno, y por ello mejorar su defensa frente al estrés por frío inmediatamente al ser expuesto a estas condiciones, mejorando además la calidad nutricional de estos frutos. La relación entre un aumento en fenoles y una mejor calidad ha sido estudiada en otros frutos, como son cerezas (Q. Zhang et al., 2021), papaya (Fan et al., 2022) y naranjas (Carmona et al., 2022).

El aumento del contenido en compuestos fenólicos en calabacín durante el primer día de almacenamiento en frío, debido en parte a una activación de su biosíntesis, es importante para proteger al fruto del estrés por frío, siendo de igual importancia la regulación de la degradación de estos compuestos. Las principales enzimas involucradas en el catabolismo de compuestos fenólicos en fruto son polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD). Ambas actividades enzimáticas se indujeron en el fruto de calabacín por el almacenamiento a 4 °C, sin embargo, la aplicación de ABA reduce la actividad PPO en todos los tiempos de almacenamiento y la actividad POD a 1 día de almacenamiento en frío comparado con los frutos control. En frutos de granada, almacenados a 4 °C, se ha demostrado una correlación positiva entre pérdida de electrolitos y las actividades PPO y POD (Nazoori et al., 2023). Ambas actividades son importantes durante el periodo postcosecha, debido a que estas enzimas catalizan las reacciones que degradan fenoles dando lugar al pardeamiento en los frutos, proceso que ocurre generalmente cuando se produce daño celular y los sustratos contenidos en la vacuola se liberan (Yoruk and Marshall, 2003). Por ello, reducir su actividad podría ayudar a mantener la calidad nutricional del fruto, reduciendo la degradación de compuestos fenólicos, previniendo del pardeamiento, y extendiendo la vida útil del fruto durante el periodo postcosecha (Cenobio-Galindo et al., 2019; Pasquariello et al., 2015; Zheng et al., 2019).

En diferentes frutos se ha demostrado que hay una relación entre ABA y la ruta de los fenilpropanoides, mediante la inducción de algunas etapas de la ruta por parte de esta fitohormona (Mattus-Araya et al., 2022), resultando en la

acumulación de una amplia variedad de compuestos fenólicos y flavonoides (Sandhu et al., 2011; Tao et al., 2020). Analizando en el fruto de calabacín el contenido en algunos de los compuestos fenólicos más representativos, se ha demostrado que la aplicación de ABA provocó una clara inducción en estos antioxidantes. El tratamiento con ABA incrementó el contenido en ácido vainílico en el exocarpo del fruto de calabacín, siendo este compuesto fenólico un antioxidante natural de frutos y vegetales (Zheng and Wang, 2001) que puede ser incorporado a algunos alimentos para mejorar las propiedades saborizantes y olfativas (Mason et al., 2021). También, en mango y aceituna (Flores et al., 2017; Vithana et al., 2018), el ácido vainílico fue el principal compuesto polifenólico medido durante el periodo postcosecha, pudiendo ser añadido además al fruto para prevenir el deterioro (Osondu et al., 2022). También observamos un incremento en los ácidos hidroxicinámicos analizados que podría ayudar a la defensa del fruto. El ferúlico es un metabolito ampliamente distribuido por los tejidos vegetales, que posee propiedades nutracéuticas (Mattila et al., 2006) y está siendo utilizado como un aditivo antioxidante con usos farmacológicos para la salud humana (Rasheed et al., 2022; Zhao and Moghadasian, 2008). Además, también se está aplicando en fruto para incrementar su vida postcosecha (Baraiya et al., 2016; H. Liu et al., 2021). Respecto al *p*-cumárico se ha probado su efecto disminuyendo el deterioro natural de los frutos durante el periodo postcosecha (X. Liu et al., 2020), lo que se atribuye a la activación de la ruta fenilpropanoides por este compuesto, mejorando la capacidad antioxidante y la defensa frente a patógenos (Yuan et al., 2019). Finalmente, la importancia de flavonoides como compuestos antioxidantes ha sido demostrada en varios trabajos, protegiendo frutos y vegetales frente al daño oxidativo durante el periodo postcosecha (Cenobio-Galindo et al., 2019; Esteban-Muñoz et al., 2021; Gil et al., 1999; Santin et al., 2021, 2019). El ABA exógeno provocó un claro aumento en la mayoría de los compuestos flavonoides analizados en exocarpo de calabacín, siendo la más abundante la quercetina, y la más inducida por esta fitohormona la luteolina. La quercetina se utiliza como tratamiento con propiedades

antifúngicas en una amplia variedad de frutos y vegetales (Mendoza et al., 2013; Sanzani et al., 2010; Zhang et al., 2018), habiendo sido probado que la acumulación de este compuesto da lugar a mejora de la tolerancia al frío (Kumar Patel et al., 2023). En melocotón se ha visto que la quercetina podría proteger las membranas celulares del estrés oxidativo producido por la muerte celular, mediante un bloqueo de las rutas ciclooxigenasa y lipoxigenasa (L. Wang et al., 2021). La luteolina se ha probado también como un inductor de la ruta fenilpropanoides, que contribuye al mantenimiento de la calidad en el fruto (X. Liu et al., 2021), además posee importantes funciones nutraceuticas y propiedades anticancerígenas, en la medicina tradicional china se han utilizado extractos de plantas ricas en luteolina para tratar algunas enfermedades, (Lin et al., 2008). Isorhamnetina, miricetina, rhoifolin y crisoeriol son también de gran importancia en el mantenimiento de la calidad postcosecha (Flores and Ruiz del Castillo, 2014; Rodrigues et al., 2010; J. Zhao et al., 2022), por lo que el aumento en estos compuestos a 1 y 5 días por el tratamiento con ABA incrementó la vida útil del fruto de calabacín durante el periodo de almacenamiento en frío.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la aplicación exógena de ácido abscísico incrementa la tolerancia al frío en el fruto de calabacín durante el periodo postcosecha, regulando la capacidad antioxidante de los frutos. Esta respuesta se debe a su capacidad de alterar actividades enzimáticas claves en este proceso, como son PAL, PPO o POD, así como a un incremento en antioxidantes no enzimáticos tan importantes para el fruto como son el ascorbato, carotenoides y compuestos fenólicos, contribuyendo además a un incremento en las propiedades nutraceuticas del fruto. Estos resultados señalan al ABA como una de las fitohormonas responsables de la tolerancia al frío, induciendo, entre otros mecanismos, el de respuesta frente a estrés oxidativo.



**Capítulo IV. Efectos bioquímicos postcosecha de la aplicación exógena de riboflavina al fruto de calabacín durante su almacenamiento en frío**



## **IV.1 Introducción**

La riboflavina es una vitamina hidrosoluble, conocida como B<sub>2</sub>, que está ampliamente distribuida en alimentos y plantas (Fischer and Bacher, 2006; Powers, 2003), involucrada en procesos metabólicos vitales para el ser humano. Se ha descrito que la deficiencia en riboflavina puede alterar algunos procesos biológicos como la absorción de hierro, el metabolismo del triptófano, la función mitocondrial y el metabolismo de otros nutrientes (Thakur et al., 2017). Esta vitamina es el precursor de coenzimas como dinucleótido de flavina-adenina (FAD) y mononucleótido de flavina (FMN), por lo que la ruta de biosíntesis de riboflavina afecta al crecimiento y desarrollo de la planta, así como a las respuestas de defensa frente a estrés mediante múltiples mecanismos (Li et al., 2012). De hecho, se ha aplicado riboflavina a frutos con el objetivo de controlar enfermedades (Hyun et al., 2022), y mejorar la calidad del fruto o controlar su senescencia (Z.-G. Wang et al., 2019), debido a que su aplicación produce cambios en aminoácidos (Pérez-Álvarez et al., 2019), en la ruta de fenilpropanoides, y tanto en ROS como en su sistema de detoxificación (Li et al., 2012). Se ha descrito que la riboflavina reduce la peroxidación de lípidos, manteniendo funcional la membrana plasmática en condiciones de estrés, y también reduce el daño oxidativo en ADN y proteínas (Olfat et al., 2022). Además, el FAD, derivado de riboflavina, es necesario para muchas enzimas antioxidantes que regulan la eliminación de peróxido de hidrógeno, incluyendo a la glutatión reductasa y la monodehidroascorbato reductasa (Deng et al., 2014). Sin embargo, es interesante destacar que la riboflavina tiene un efecto prooxidante, demostrándose que elevadas concentraciones de riboflavina en plantas pueden inducir la producción de ROS, lo que conlleva a un daño oxidativo en la célula vegetal (Deng et al., 2014). Habiéndose probado esta vitamina mejorando la tolerancia al frío inhibiendo las actividades enzimáticas PPO y POD, así como aliviando la peroxidación lipídica de membrana en fresa almacenada a baja temperatura (Zhang et al., 2023).

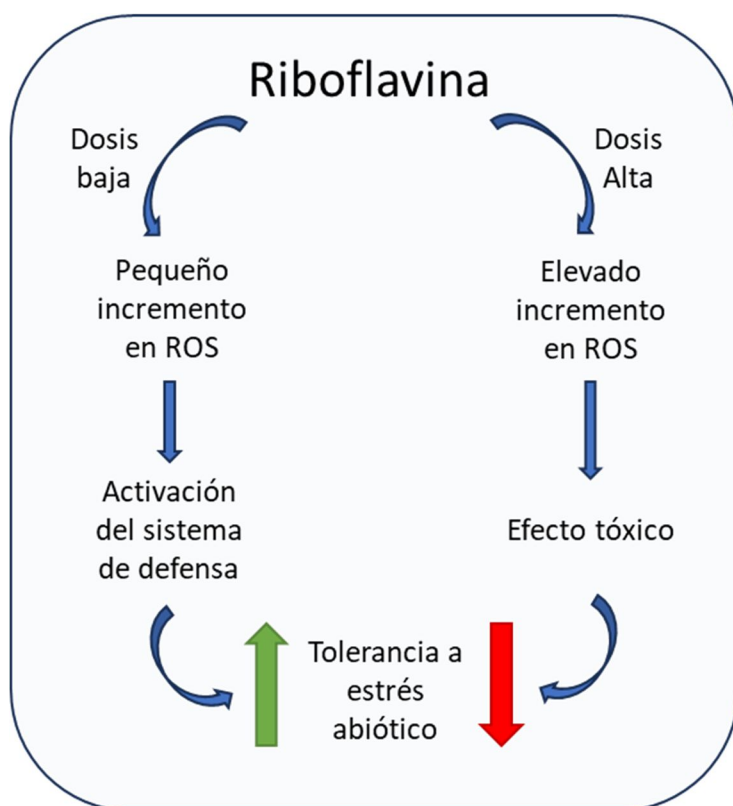


**Fig.IV.1:** Modelo esquemático de los dos papeles reguladores que puede mostrar la riboflavina, sobre la producción de ROS en plantas y fruto bajo condiciones de estrés por sequía y almacenamiento en frío (Deng et al., 2014; Zhang et al., 2023).

En fruto de calabacín se ha demostrado que el ácido abscísico (ABA) es una hormona que juega un papel de vital importancia en la tolerancia al frío durante el periodo postcosecha (Carvajal et al., 2017; Castro-Cegrí et al., 2023c), siendo esta respuesta frente a estrés mediada por cambios en el metabolismo primario, aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares solubles, así como por inducción de rutas del metabolismo secundario, entre las que se destaca la ruta de biosíntesis de riboflavina como una de las más importantes (Castro-Cegrí et al., 2023a). La síntesis de riboflavina en las primeras horas de almacenamiento a baja temperatura puede ser crucial en los mecanismos de tolerancia al frío del fruto de calabacín (Castro-Cegrí et al., 2023a).

Por ello, con el objetivo de determinar el papel que desempeña la riboflavina en la tolerancia al frío del fruto de calabacín durante el periodo

postcosecha, se investigó el efecto de la aplicación de esta vitamina sobre el mantenimiento de la calidad del fruto durante el almacenamiento a 4 °C, estudiando el metabolismo fenólico, así como la modificación del perfil metabólico de los frutos mediante UPLC-QTOF/ESI-MS (ver apartado de MyM 3.7.2).

## **IV.2 Resultados**

### ***IV.2.1. Evaluación de los parámetros de calidad postcosecha***

Para seleccionar la dosis de riboflavina más adecuada a emplear en el fruto de calabacín se llevó a cabo un experimento en el que se analizaron los tratamientos control (agua), 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 mM de riboflavina, para porcentaje de pérdida de peso e índice de daños por frío tras 1, 5 y 14 días de almacenamiento en frío, resultando la dosis 0.5 mM de riboflavina la que mejor resultado mostró, sobre todo en índice de daños por frío (Tabla IV.1). Tras realizar este experimento se llevó a cabo un segundo experimento sólo con la dosis de 0.5 mM para revalidar los resultados y obtener material vegetal para llevar a cabo los diferentes análisis.

En la figura IV.2 se muestran los resultados de pérdida de peso, daños por frío y firmeza, de frutos control y tratados con 0.5 mM de riboflavina, y almacenados durante 14 días a 4 °C. El almacenamiento a bajas temperaturas provocó una importante reducción en la calidad del fruto de calabacín dando como resultado un aumento en la pérdida de peso de, 1.9; 4.9 y 11 % a los 1, 5 y 14 días de almacenamiento en frío respectivamente, en frutos control. Los daños por frío en frutos control también aumentaron durante la frigoconservación, alcanzándose valores de 1.5 y 2.4 a los 5 y 14 días respectivamente. Además, el estrés por frío provocó una disminución en la firmeza de los frutos, incrementando por lo tanto el ablandamiento. En frutos control, la firmeza se redujo en torno a un 60% tras 5 y 14 días de almacenamiento en frío comparado a el fruto recién cosechado (T0). La aplicación de riboflavina disminuyó significativamente la pérdida de peso comparado con el control a 5 y 14 días de frigoconservación (Fig.IV.2A), mientras que una reducción más drástica se observa en el índice de daños por frío, llegando a reducir el tratamiento con la vitamina en un 50% respecto a los frutos control en dichos periodos de almacenamiento (Fig.IV.2B).

**Tabla IV.1:** Cambios en el porcentaje de pérdida de peso (%) y daños por frío en una escala de 0 a 3 en frutos control (C) y tratados con dosis crecientes de riboflavina (0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 mM), durante el periodo de almacenamiento a 4 °C (0, 1, 5 y 14 días).

|                      | Días a 4°C | C                       | 0.1                      | 0.25                     | 0.5                    | 1                        | 2                       | MDS<br><i>p</i> <0.05 |
|----------------------|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Pérdida de peso (%)  | 1          | 1.88±0.07 <sup>a</sup>  | 1.66±0.04 <sup>a</sup>   | 1.68±0.06 <sup>a</sup>   | 1.68±0.06 <sup>a</sup> | 1.72±0.06 <sup>a</sup>   | 1.73±0.06 <sup>a</sup>  | 0.164                 |
|                      | 5          | 4.79±0.15 <sup>a</sup>  | 4.67±0.18 <sup>ab</sup>  | 4.73±0.15 <sup>ab</sup>  | 4.01±0.09 <sup>c</sup> | 4.61±0.13 <sup>ab</sup>  | 4.37±0.13 <sup>bc</sup> | 0.387                 |
|                      | 14         | 10.98±0.41 <sup>a</sup> | 10.49±0.38 <sup>ab</sup> | 10.44±0.39 <sup>ab</sup> | 8.38±0.21 <sup>c</sup> | 10.01±0.38 <sup>ab</sup> | 9.65±0.31 <sup>bc</sup> | 1.047                 |
| Daños por frío (0-3) | 1          | 0±0 <sup>a</sup>        | 0±0 <sup>a</sup>         | 0±0 <sup>a</sup>         | 0±0 <sup>a</sup>       | 0±0 <sup>a</sup>         | 0±0 <sup>a</sup>        | 0                     |
|                      | 5          | 1.5±0.15 <sup>a</sup>   | 1.39±0.14 <sup>ab</sup>  | 1.43±0.11 <sup>ab</sup>  | 0.75±0.13 <sup>c</sup> | 1.4±0.13 <sup>ab</sup>   | 1.08±0.1 <sup>bc</sup>  | 0.51                  |
|                      | 14         | 2.36±0.21 <sup>ab</sup> | 2.5±0.25 <sup>ab</sup>   | 2.64±0.19 <sup>a</sup>   | 1.31±0.33 <sup>c</sup> | 2.24±0.2 <sup>ab</sup>   | 1.83±0.17 <sup>bc</sup> | 0.66                  |

Los datos presentados son medias de tres réplicas biológicas, de seis frutos cada una. Se han utilizado diferentes letras en cada periodo de almacenamiento para representar las diferencias significativas entre los tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

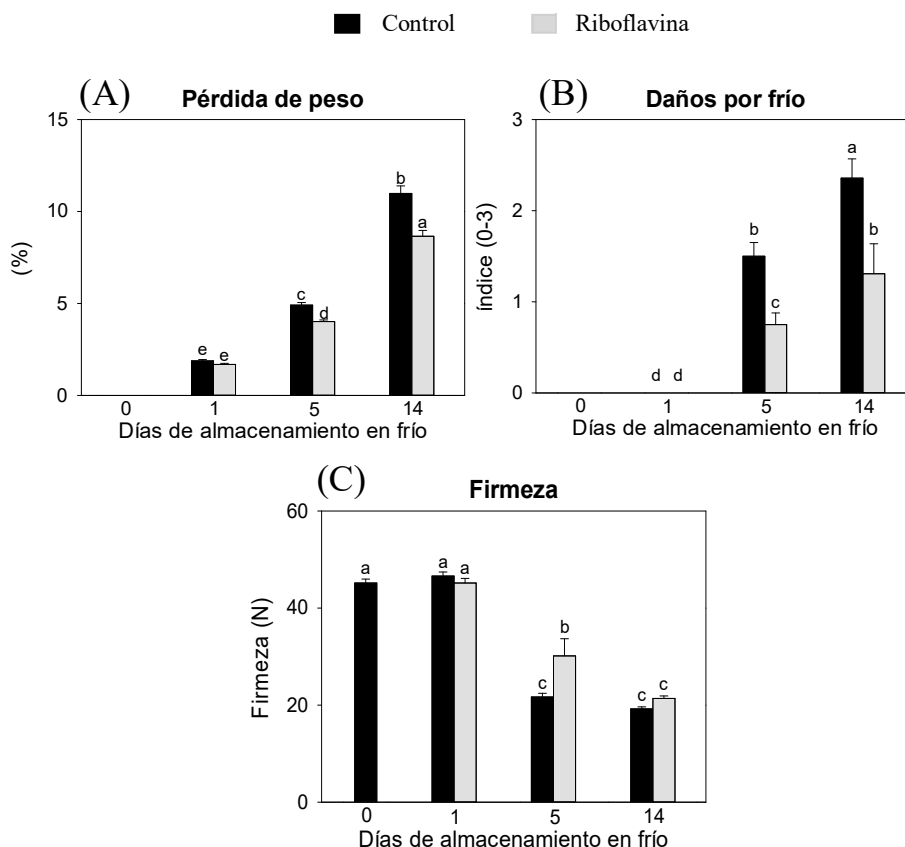


**Fig.IV.2:** Cambios en el porcentaje de pérdida de peso, índice de daños por frío y firmeza en frutos de calabacín control y tratados con riboflavina (0.5 mM) tras 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento a 4 °C. Los datos mostrados son medias de 18 frutos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre distintos tiempos y tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a la firmeza, si comparamos frutos sin tratar con tratados, sólo se detectaron diferencias significativas a los 5 días de almacenamiento, donde la el tratamiento con riboflavina mostró mayor firmeza (Fig.IV.2C).

Para cuantificar los daños sufridos en las membranas de las células de exocarpo del fruto de calabacín se analizó el porcentaje de pérdida de electrolitos, y el nivel de peroxidación lipídica mediante la acumulación de malondialdehído (Fig.IV.3).

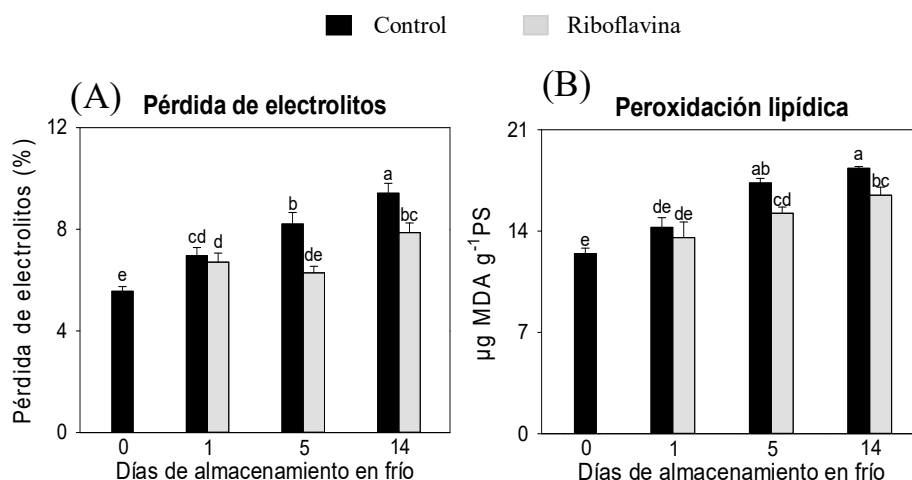


**Fig.IV.3:** Evaluación de pérdida de electrolitos (A), y peroxidación lipídica (B), en exocarpo de frutos control y tratados con riboflavina (0.5 mM), a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento a 4 °C. Los datos presentados son medias de tres réplicas biológicas, de seis frutos cada una. Diferentes letras indican diferencias significativas entre distintos tiempos y tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

El porcentaje de pérdida de electrolitos aumentó durante el periodo de almacenamiento debido al estrés por frío, sin embargo, este aumento fue menor con la aplicación de riboflavina, disminuyendo dicho porcentaje significativamente a 5 y 14 días de frigoconservación, respecto a los frutos control (Fig.IV.3A). Por otra parte, se observó la misma tendencia para la peroxidación lipídica, con un aumento durante el periodo postcosecha en todos los frutos debido al frío, pero siendo menor el contenido de MDA en los frutos tratados respecto a los control a los 5 y 14 días (Fig.IV.3B).

#### ***IV.2.2. Antioxidantes no enzimáticos***

El contenido en fenoles totales y flavonoides se representa en la figura IV.4. En cuanto al contenido en fenoles totales se observó un aumento significativo en el primer día de almacenamiento en frío, por parte del tratamiento con riboflavina, así como al final del periodo de almacenamiento, donde existe un incremento del 177% respecto a los frutos control (Fig.IV.4A).

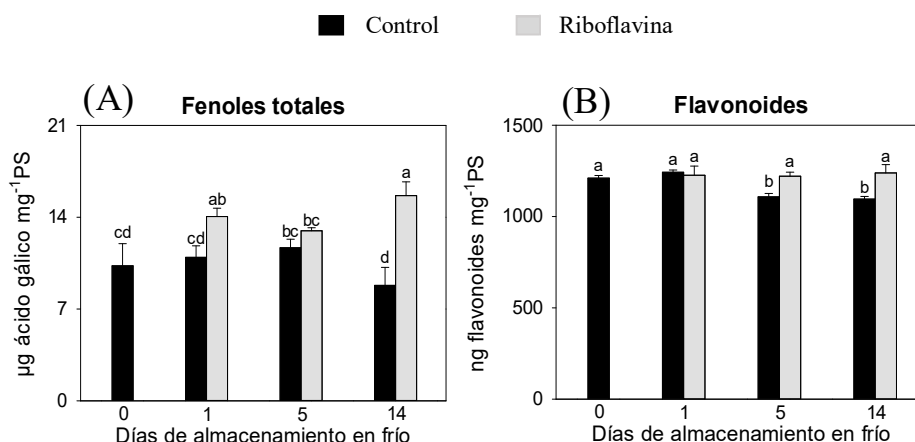


**Fig.IV.4:** Determinación del contenido en compuestos fenólicos totales (A) y flavonoides (B) en exocarpo de frutos control y tratados con riboflavina (0.5 mM), a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento a 4 °C. Los datos presentados son medias de tres réplicas biológicas, de seis frutos cada una. Diferentes letras indican diferencias significativas entre distintos tiempos y tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, se observó una disminución en el contenido en flavonoides durante el almacenamiento en frío en los frutos control, mientras que los tratados con riboflavina pudieron mantener unos niveles similares a los frutos recién cosechados durante todo este periodo (Fig.IV.4B).

### IV.2.3. Enzimas relacionadas con compuestos fenólicos

Como se ha descrito previamente, dos de las enzimas con mayor implicación en la síntesis y degradación de compuestos fenólicos son la fenilalanina amonio liasa (PAL) y polifenol oxidasa (PPO), respectivamente. Ambas actividades enzimáticas se muestran en la figura IV.5. En este experimento se demostró la implicación de la riboflavina en la ruta fenilpropanoides, ya que la aplicación de esta vitamina incrementa la actividad enzimática PAL durante todo el periodo de almacenamiento respecto a los frutos no tratados, mostrando el mayor incremento a 5 días, con un aumento de la actividad del 163 % respecto a los frutos control (Fig.IV.5A). Por otra parte, se observó un elevado aumento en la actividad PPO debido al estrés por frío en los frutos control en los primeros días de almacenamiento. Por el contrario, el tratamiento con riboflavina fue capaz de producir una importante disminución

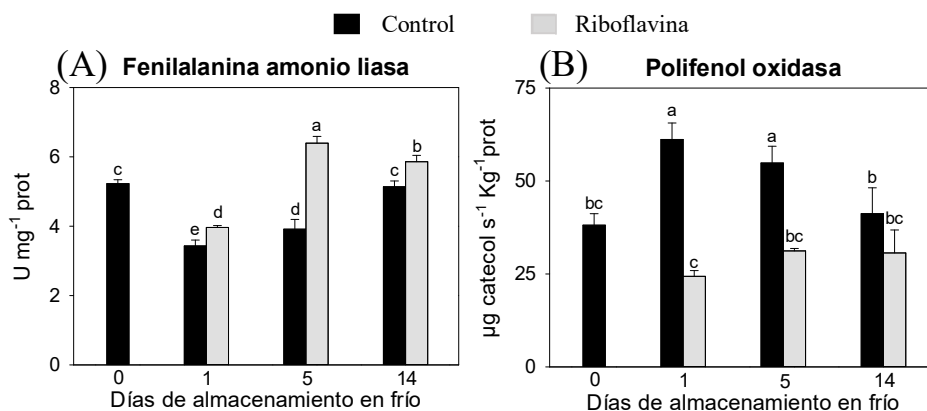


**Fig.IV.5:** Determinación de actividad enzimática fenilalanina amonio liasa (A) y polifenol oxidasa (B) en exocarpo de frutos control y tratados con riboflavina (0.5 mM), a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento a 4 °C. Los datos presentados son medias de tres réplicas biológicas, de seis frutos cada una. Diferentes letras indican diferencias significativas entre distintos tiempos y tratamientos, de acuerdo al test Duncan ( $p < 0.05$ ).

en la degradación de fenoles por esta enzima, precisamente a 1 y 5 días de almacenamiento, cuando mayores niveles mostraron los frutos control, disminuyendo en un 60 y 45 % la actividad respecto a los frutos control, respectivamente (Fig.IV.5B).

#### ***IV.2.4. Efecto del almacenamiento en frío y tratamiento con riboflavina en el perfil metabólico por estadística multivariante***

Las muestras de exocarpo de los frutos control y tratados con riboflavina a los diferentes días de almacenamiento en frío se utilizaron para realizar un análisis metabólico no dirigido (UHPLC-HRMS), dando como resultado 2156 posibles compuestos anotados. Con el objetivo de profundizar en la influencia de ambos factores en el perfil metabólico, se realizó un análisis de agrupamiento no supervisado “unsupervised hierarchical cluster analysis” (HCA) con el que se analizaron las similitudes y diferencias entre las muestras debido a su perfil metabólico bruto (Fig.IV.6).

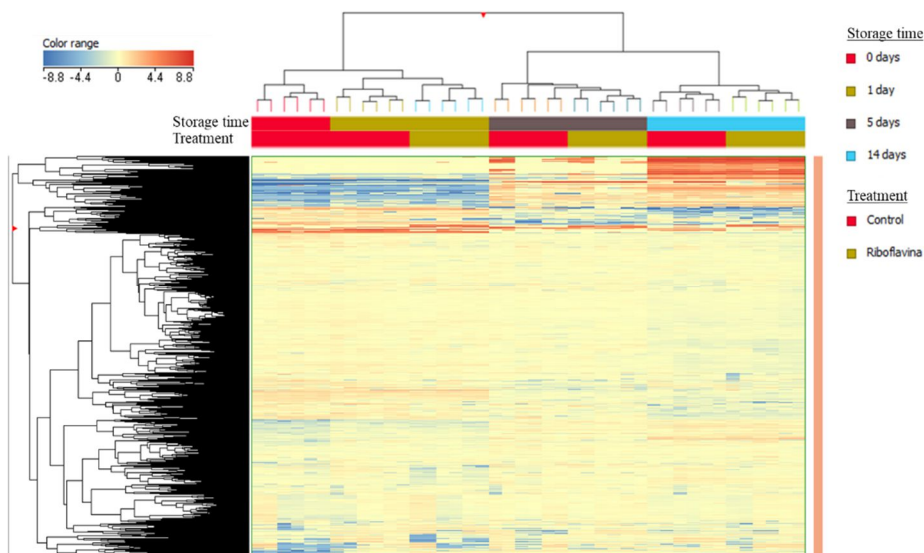


**Fig.IV.6:** Heatmap resultante del análisis HCA (Euclidean distance, Ward's linkage method) realizado considerando los valores de media normalizada de Log2(FC) de los metabolitos identificados en las diferentes muestras, correspondientes a frutos control o tratados con riboflavina (0.5 mM) a 0, 1, 5 y 14 días de almacenamiento en frío.

Como se puede observar los daños sufridos por el almacenamiento en frío fue el factor más determinante en la modificación de los metabolitos del exocarpo, agrupando en un conjunto los frutos no dañados (0 y 1 día de almacenamiento) y en otro conjunto los dañados (5 y 14 días). Posteriormente, las muestras se agruparon por periodo de almacenamiento, y finalmente, aquellas muestras pertenecientes al grupo de frutos tratados con riboflavina se separaron de las muestras control para cada día de almacenamiento en frío. Estos resultados sugieren que los daños por frío, sufridos en los frutos de calabacín expuestos a bajas temperaturas, tuvieron un impacto clave en el perfil de acumulación de un amplio rango de metabolitos, que fue modificado significativamente por la influencia de la riboflavina (Fig.IV.6).

Con el objetivo de explorar cambios composicionales del exocarpo, debido exclusivamente a la aplicación de riboflavina, en los diferentes días de almacenamiento, se realizó un análisis supervisado “ortogonal projection to latent structures discriminant analysis” (OPLS-DA). Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con riboflavina afecta a la composición del exocarpo, ya que todos los modelos (para 1, 5 y 14 días) presentaron parámetros

de alta calidad en términos de goodness-of-fit ( $R^2 = 0.999$ ,  $0.999$ , y  $0.997$ , respectivamente) y goodness-of-prediction ( $Q^2 = 0.875$ ,  $0.8$ , y  $0.888$ , respectivamente) (Fig.IV.7A, B, y C). A través de un análisis variable importance in projection (VIP) para cada modelo OPLS-DA, los metabolitos más involucrados en la discriminación de los grupos, 163, 151 y 183 marcadores VIP (VIP score  $> 1.4$ ), para 1, 5 y 14 días de almacenamiento, respectivamente, se agruparon por clases y se representaron en los diagramas de sectores (Fig.IV.7D, E y F).

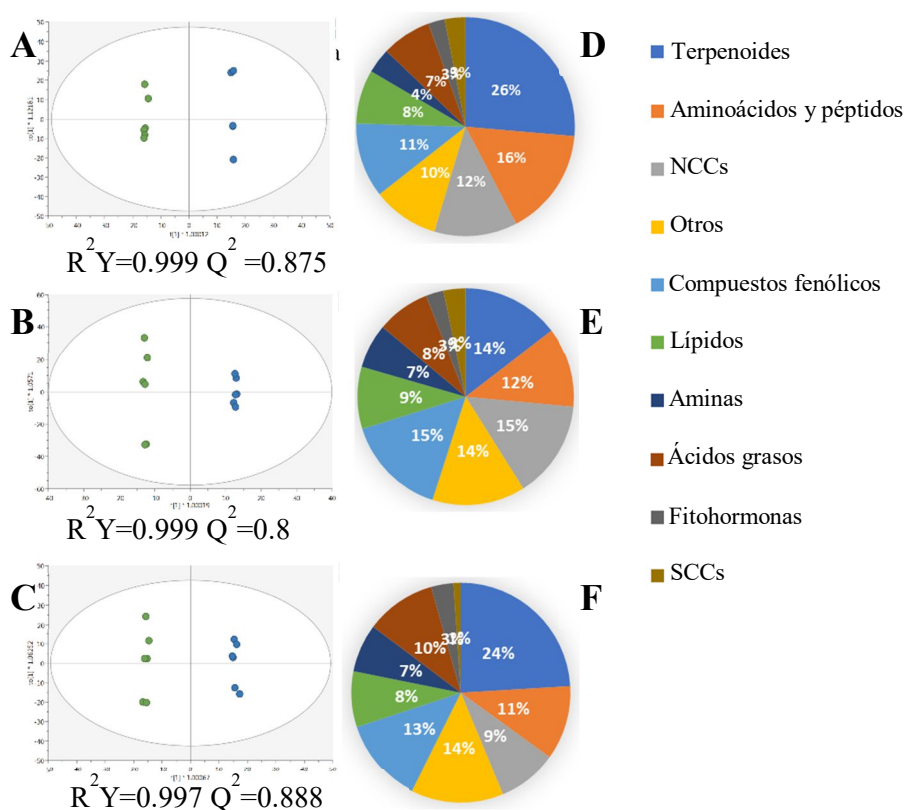


**Fig.IV.7:** Gráficas del OPLS-DA realizados para discriminar entre las muestras de calabacín control (verde) y tratadas con riboflavina (azul) tras 1 (A), 5 (B) y 14 (C) días de almacenamiento en frío. Los diagramas de sectores muestran el porcentaje de las principales clases de compuestos marcadores seleccionados para la diferenciación de las muestras por el tratamiento con riboflavina en el análisis, tras 1 (D), 5 (E) y 14 (F) días de almacenamiento en frío.

Esto permitió evaluar la proporción de las diferentes clases de metabolitos en esta discriminación, y cómo evoluciona a lo largo del periodo postcosecha, siendo terpenoides, aminoácidos, NCCs y compuestos fenólicos los grupos de compuestos más importantes en dicha discriminación.

### **IV.3 Discusión**

En los últimos años se ha demostrado la importancia de la riboflavina en los mecanismos de defensa frente a estreses en diversos frutos como pera o uva (Li et al., 2012; Pérez-Álvarez et al., 2019). Además, en fruto de calabacín se probó que el ABA, una de las hormonas principales en la regulación de la tolerancia al frío (Benítez et al., 2022; Carvajal et al., 2017; Castro-Cegri et al., 2023c), indujo la acumulación de riboflavina a 1 día de almacenamiento en frío, lo que podría desencadenar otros mecanismos de defensa frente a este estrés (Castro-Cegri et al., 2023a). Por ello, es interesante dilucidar el efecto directo de la riboflavina en el mantenimiento de la calidad del fruto de calabacín, así como los mecanismos de respuesta frente a estrés inducidos por esta vitamina y los cambios metabólicos sufridos.

El almacenamiento en frío provocó en el fruto de calabacín de la variedad “Logos” una importante disminución en su calidad, dando lugar a un gran aumento en la pérdida de peso e índice de daños por frío, así como a una notable disminución en la firmeza del fruto, lo que equivale a un incremento en el ablandamiento. Dichos parámetros provocan una notoria depreciación del fruto por parte del consumidor final, lo que puede dar lugar a unas graves pérdidas económicas. Con el objetivo de reducir estos daños fisiológicos y mantener el valor nutricional del fruto durante el periodo postcosecha se empleó riboflavina exógena, ya que en estudios previos se relacionó este metabolito con la defensa del fruto frente al frío (Castro-Cegri et al., 2023a). La concentración empleada fue de 0.5 mM debido a que en un experimento previo se probaron las concentraciones 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 mM, resultando 0.5 mM la más idónea. El tratamiento con esta vitamina mostró un efecto significativo en cuanto a reducción de pérdida de peso, y también en mantenimiento de la firmeza a 5 días, sin embargo, el efecto más notorio se observó en el índice de daños por frío, reduciendo a la mitad los daños. Dichos resultados concuerdan con los descritos en otros frutos como el pimiento, en el que se aplicó riboflavina y se observó una reducción de los daños de

aproximadamente el 50 % tras 9 días a 8 °C, siendo aún más importante esta reducción en comparación con el fruto control, cuando el periodo de almacenamiento fue de 12 días a 4 °C (Pintos et al., 2022). También en fresa almacenada durante 12 días a 4 °C la aplicación de riboflavina tiene un efecto beneficioso (Zhang et al., 2023).

Estos daños por frío, apreciables visualmente, se deben a que el estrés sufrido en las células del exocarpo da lugar a degradación de las membranas, lo que se traduce en muerte celular. Este parámetro se puede evaluar mediante el porcentaje de pérdida de electrolitos y la peroxidación lipídica. De hecho, se observó un notable incremento de este porcentaje durante el almacenamiento en frío en los frutos control, siendo capaz el tratamiento con riboflavina de disminuir este incremento, lo que indica una menor degradación celular debida a esta aplicación de la vitamina. Una respuesta similar se ha detectado en pimiento tratado con riboflavina y expuesto a baja temperatura (Pintos et al., 2022). El tratamiento con ABA en fruto de calabacín mostró idénticos resultados, por lo que parte de esta respuesta podría deberse al incremento en riboflavina que se induce en el primer día de almacenamiento (Castro-Cegri et al., 2023c). Además, otro de los parámetros más utilizados para probar el daño en membrana es medir el nivel de peroxidación lipídica, a través del contenido en MDA, donde se observó una tendencia similar, con un incremento a lo largo del almacenamiento y una disminución por parte del tratamiento, describiéndose en fresa o manzana la misma respuesta frente a la peroxidación lipídica por el almacenamiento en frío y el tratamiento con riboflavina (Zha et al., 2022; Zhang et al., 2023). Esta disminución de la peroxidación lipídica puede estar asociada a una disminución del contenido en ROS debido a que el tratamiento con riboflavina induzca los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Algunas enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa, enzima clave en el ciclo Halliwell-Asada, necesita el FAD que es un derivado de riboflavina (Deng et al., 2014). Por otro lado, para disminuir el estrés oxidativo, los tejidos vegetales pueden inducir la acumulación de

metabolitos con función antioxidante, como son los compuestos fenólicos o los flavonoides, derivados de la ruta de fenilpropanoides (Naikoo et al., 2019; L. Wang et al., 2019). De hecho, se pudo observar un aumento en la acumulación de estos compuestos debido al tratamiento con riboflavina en el fruto de calabacín almacenado a bajas temperaturas, comparado con los frutos control. Este mayor contenido en compuestos antioxidantes mejora la tolerancia frente a estrés y la calidad nutricional de los frutos, por lo que el tratamiento con riboflavina en el fruto de calabacín se mostró efectivo frente al estrés por frío, mostrando resultados similares a los obtenidos por este tratamiento en manzana (Zha et al., 2022). Para controlar el contenido en estos compuestos antioxidantes no enzimáticos debe regularse tanto la producción como su degradación. El primer paso enzimático de la ruta de fenilpropanoides se debe a la acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL), por ello el aumento significativo que se observa en el fruto de calabacín tratado con riboflavina durante todo el periodo de almacenamiento, con máxima inducción a 5 días de frigoconservación, es de vital importancia para mantener unos niveles altos de estos compuestos, así como lo es la regulación de su degradación, siendo la polifenol oxidasa (PPO) una de las enzimas más importantes en este proceso. De hecho, se observó un claro aumento de la actividad de esta enzima en los frutos control debido a la exposición a bajas temperaturas, mostrando los niveles más altos en el primer día de almacenamiento, sin embargo, el tratamiento con riboflavina consiguió reducir este incremento haciendo que se mostraran niveles de actividad similares a los frutos recién cosechados durante todo el almacenamiento en frío. Esta temprana inducción en la producción de compuestos derivados de esta ruta, así como la reducción de su degradación, cuando aún no han aparecido los daños, puede ser crucial para la defensa del fruto frente al estrés por frío, como ya se ha demostrado en otros frutos donde el tratamiento con riboflavina incrementó la actividad PAL (Li et al., 2012; Zhang et al., 2023) y/o reprimió la actividad PPO (Zha et al., 2022; Zhang et al., 2023).

Además de estos compuestos, tanto el almacenamiento en frío como la riboflavina podrían estar alterando la síntesis de una gran variedad de metabolitos, por ello se estudió la implicación de estos tratamientos en el perfil metabólico de los frutos mediante UPLC-HRMS. Los metabolitos identificados en este análisis se asociaron a una enorme variedad de familias de compuestos, revelando una alta heterogeneidad metabólica y complejidad de la matriz de compuestos bajo estudio. Se identificaron un gran número de compuestos fenólicos (flavonoides, lignanos, antocianinas, estilbenos, etc.), terpenoides (monoterpenoides, diterpenoides, sesquiterpenoides...), glucosinolatos y alcaloides, entre otros. Analizando el perfil metabólico completo mediante el HCA se observó que el factor que fue más importante en la agrupación de las muestras fue el almacenamiento en frío, siendo además el tratamiento con riboflavina clave en la agrupación dentro de cada tiempo de almacenamiento. Este efecto del tratamiento se confirmó mediante OPLS-DA para cada día de almacenamiento, mostrando siempre diferencias significativas. Analizando los metabolitos más importantes para la separación de las muestras control respecto de las tratadas con riboflavina, la fracción liposoluble (terpenoides, lípidos y ácidos grasos) fue la más representativa (> 30 % de todos los compuestos), lo que es de una gran importancia debido a que la cutícula proporciona una barrera protectora frente a estreses bióticos y abióticos, previniendo daños por deshidratación debido a esta composición lipídica (Kong et al., 2018; J. Liu et al., 2020; Xu et al., 2021), seguido de aminoácidos y péptidos (11-16 %), NCCs (9-15 %) y compuestos fenólicos (11-15 %).

En este trabajo, seleccionamos una concentración adecuada de riboflavina con la finalidad de mantener la calidad postcosecha del fruto de calabacín durante su almacenamiento a baja temperatura. El tratamiento reduce la pérdida de peso, los daños por frío e incrementa la firmeza, manteniendo la integridad de la membrana, ya que evita la pérdida de electrolitos y la peroxidación lipídica. Además, induce la acumulación de metabolitos antioxidantes no enzimáticos como los compuestos fenólicos y modifica la

composición de compuestos liposolubles que contribuiría a mantener la integridad de la célula vegetal. Por lo tanto, la riboflavina se podría usar como un compuesto GRAS adecuado para mantener la calidad postcosecha del fruto de calabacín.



## **Capítulo V. Identificación de QTLs asociados a mecanismos fisiológicos de tolerancia al frío en el fruto de calabacín**



## V.1 Introducción

En la actualidad, la rápida evolución de las nuevas tecnologías de secuenciación ha permitido aumentar la disponibilidad de genomas secuenciados de las diferentes especies de plantas cultivadas mundialmente. La disponibilidad de herramientas genómicas presenta un gran avance en el conocimiento de procesos biológicos que controlan caracteres agronómicos de interés, lo que supone un incremento exponencial de la eficiencia en los programas de mejora genética de los distintos cultivos.

A pesar de la gran relevancia del cultivo de calabacín dentro de la familia Cucurbitaceae, hasta hace poco no se disponía de recursos genómicos en esta especie. Estudios previos ya habían sugerido un cierto grado de duplicación del genoma de calabacín a partir de la construcción de mapas genéticos en esta especie (Esteras et al., 2012; Montero-Pau et al., 2017). Montero-Pau et al., 2018 realizaron el ensamblaje *de novo* y la anotación del genoma de *C. pepo*, describiendo un tamaño estimado de 263 Mb y 27,868 modelos de genes organizados en 20 pseudocromosomas. Los análisis de sintenia con otras especies de cucurbitáceas demostró que se había producido un reordenamiento cromosómico intenso y se detectó un elevado número de genes parálogos, viéndose que los genomas de las especies del género *Cucurbita* se componen de dos subgenomas, los cuales han conservado un número similar de genes y ninguno es dominante en cuanto a niveles generales de expresión (Montero-Pau et al., 2018; Sun et al., 2017). Esta duplicación del genoma completo no se ha observado en otras especies de la familia Cucurbitaceae cuya secuencia se conoce, como el pepino (Huang et al., 2009), el melón (Garcia-Mas et al., 2012) y la sandía (Guo et al., 2013).

La secuencia genómica completa anotada de *C. pepo*, junto con el resto de los genomas descritos de las distintas especies de la familia Cucurbitaceae, están disponibles en la base de datos Cucurbit Genomic Database (CuGenDBv2; <http://cucurbitgenomics.org/v2/>) (Yu et al., 2023). La generación de las secuencias de genomas completos ha permitido

posteriormente la identificación, de una forma más rápida y eficiente, de variantes en genes de interés agronómico, tanto en la variabilidad natural como en la variabilidad inducida en las diferentes especies de la familia Cucurbitaceae. Recientemente se ha publicado en CuGenDBv2 una plataforma de genotipado realizada mediante la técnica de genotipado basado en secuenciación (GBS). Esta plataforma contiene el genotipo de 830 accesiones de la variabilidad natural de *C. pepo*, 372 accesiones de *C. maxima* y 314 de *C. moschata*. Además, se ha publicado en la misma base de datos los polimorfismos de 209 accesiones de *C. pepo* a partir de la resecuenciación del genoma completo de las mismas. Esta información está permitiendo el empleo de nuevas metodologías de análisis genético como el estudio de asociación del genoma completo (GWAS), así como la búsqueda directa de variantes en genes de interés (Hernandez et al., 2023). Otra de las estrategias para detectar regiones del genoma que controlan caracteres de interés en gran cantidad de cultivos es la aplicación del análisis de población segregante en combinación con la resecuenciación del genoma completo (BSAseq). Esta metodología permite la agrupación de material genético de plantas (bulk) que presentan el mismo fenotipo objeto de estudio, dentro de poblaciones segregantes, seguido de la resecuenciación de los bulks (Takagi et al., 2013; Zou et al., 2016). El estudio de las frecuencias alélicas en cada uno de los grupos y su comparación permite identificar regiones genómicas con frecuencias diferenciales entre ambos grupos con distinto fenotipo, y que se asocian con dicho carácter “quantitative trait locus” (QTL). Basándose en esta metodología se han desarrollado herramientas de análisis como el software “QTLseqr” (Mansfeld and Grumet, 2018) que ha facilitado en gran medida su aplicación y ha permitido que se convierta en una de las estrategias más utilizadas. BSAseq se ha utilizado para estudiar caracteres de interés en distintos cultivos de la familia Cucurbitaceae, por ejemplo, en sandía para estudiar la presencia del patrón de floración y la aparición de monoecia o andromonoecia (Aguado et al., 2020), el hábito de crecimiento (Njogu et al., 2020) o resistencias a distintas enfermedades en pepino (Pujol et al., 2019), o el color de la cubierta de la semilla en melón (Hu

et al., 2022). En los últimos años la estrategia BSAsseq también está siendo ampliamente utilizada en las especies del género *Cucurbita* y, especialmente, en calabacín. En esta especie nos ha permitido detectar mutaciones en genes involucrados en la biosíntesis o percepción de distintas hormonas como etileno (García et al., 2020a, 2020b) o jasmonatos (Cebrián et al., 2023) y que presentan alteraciones en el morfotipo sexual y el cuajado y desarrollo de los frutos. De esta forma, partiendo como base de la variabilidad natural o de variabilidad inducida de *C. pepo*, como es el caso de las colecciones de mutantes, esta metodología está suponiendo un avance crucial para los estudios de genética funcional en esta especie. Esto permite profundizar en el conocimiento de la función de los genes, así como de las regiones genómicas implicadas en distintos procesos biológicos que controlan caracteres de interés agronómico. Por ello, tras analizar en este trabajo la resecuenciación de bulks, de plantas que producen frutos tolerantes y plantas que producen frutos sensibles al estrés por frío, el objetivo fue identificar aquellas regiones genómicas que presentaran una importante implicación en la expresión de este carácter, pudiendo incluso llegar a identificar genes, que debido a la función anotada que se les ha asignado podrían ser responsables de la regulación de la tolerancia al frío en fruto de calabacín, y con ello posibles candidatos para futuros programas de mejora.

## V.2 Resultados

### V.2.1. Evaluación de los parámetros de calidad postcosecha

Los híbridos comerciales “Sinatra” (planta que produce frutos sensibles al frío) y “Natura” (planta que produce frutos tolerantes al frío) se usaron para llevar a cabo este estudio debido a sus fenotipos contrastantes para la tolerancia al frío. El experimento se llevó a cabo como se indica en el apartado 3.1.4 del material y métodos. Se cosecharon frutos de cada planta individual y se almacenaron a 4 °C durante 14 días para evaluar los parámetros de calidad postcosecha, pérdida de peso y daños por frío, usados para estudiar la segregación de la tolerancia al frío, esperando diferencias en las poblaciones evaluadas (Fig.V.1).

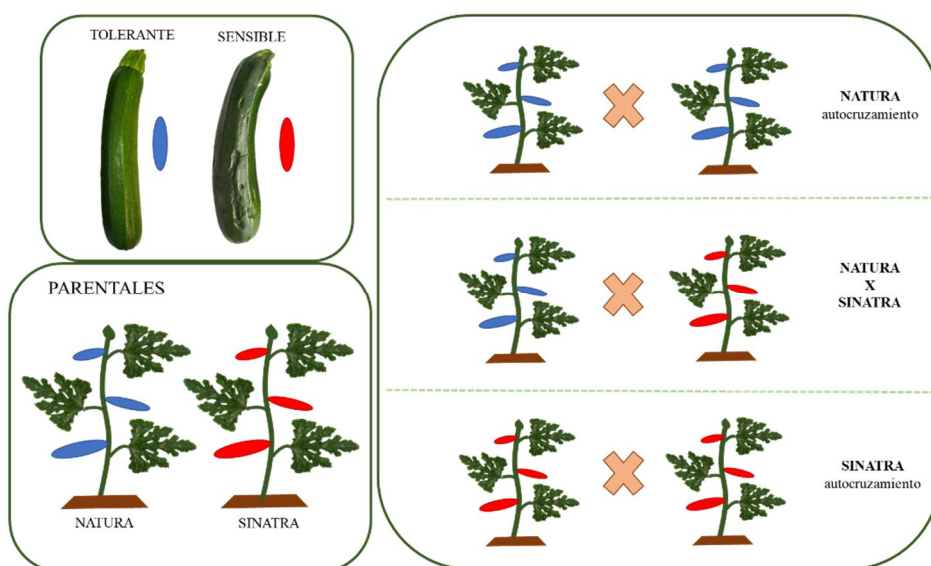


**Fig.V.1:** Representación esquemática de los parentales y cruces analizados en este estudio. Los diferentes colores muestran los fenotipos mostrados por el parental “Natura”, que produce frutos tolerantes al frío (azul), y “Sinatra” que produce frutos sensibles (rojo).

Los frutos “S” fueron sensibles a las condiciones de almacenamiento en frío, con índices de daños por frío (CI) > 2.5 y pérdida de peso (WL) > 11 %, mientras que los frutos “N” presentaron una mayor tolerancia a este estrés, teniendo CI < 1.5 y WL < 9 % (Fig.V.2).

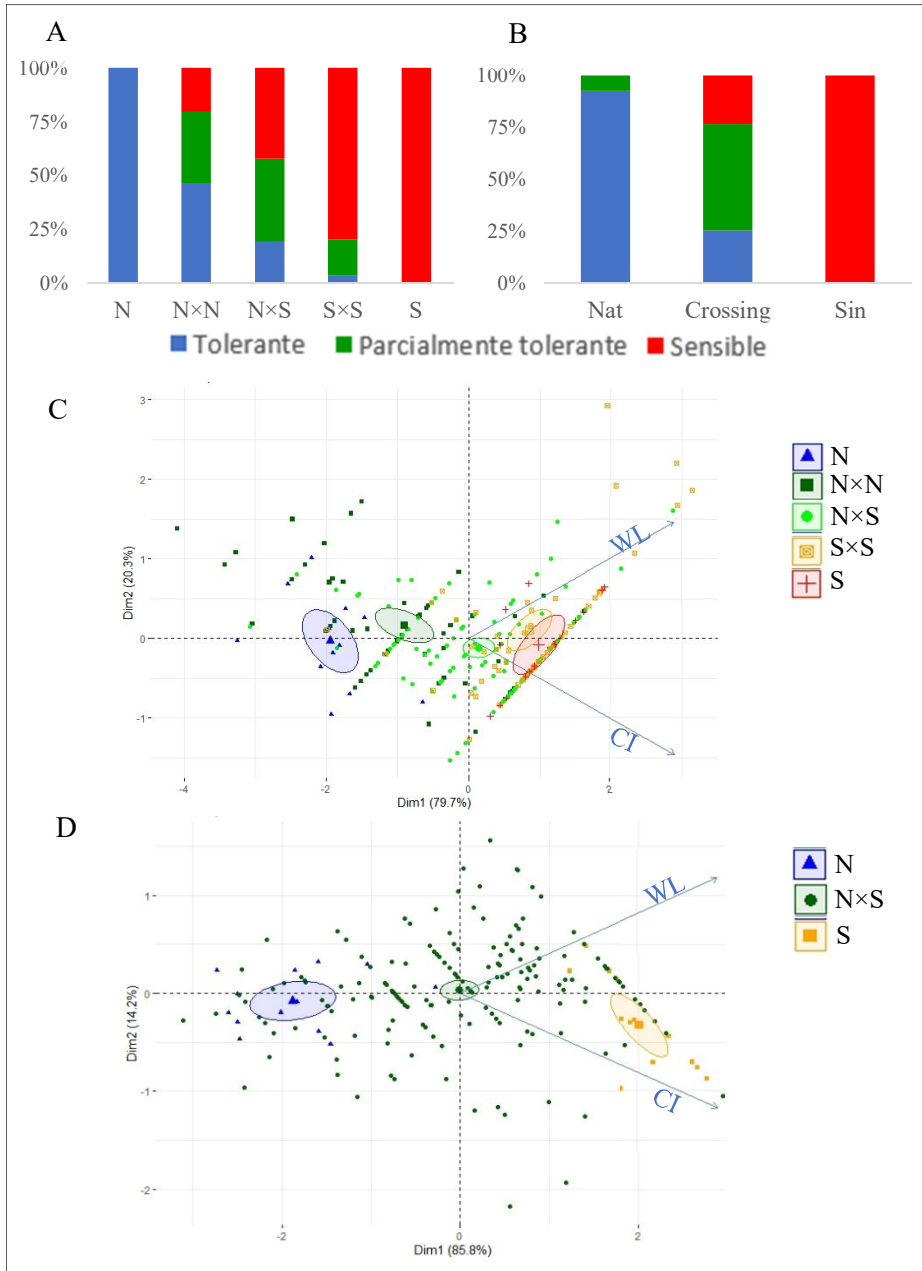


**Fig.V.2:** Clasificación fenotípica de los cruces entre “Natura” (N) y “Sintra” (S), dependiendo de la calidad postcosecha de los frutos en las diferentes poblaciones analizadas. (A) y (B) muestran el % de plantas tolerantes, parcialmente tolerantes y sensibles de los experimentos realizados en 2019 y 2021, respectivamente. En (C) y (D) se muestra el análisis de componentes principales (PCA) de la campaña 2019 y 2021, respectivamente. Las plantas están representadas en el gráfico dependiendo de la pérdida de peso (flecha superior; WL) y daños por frío (flecha inferior, CI). Los círculos de diferentes colores representan las diferencias significativas entre los grupos  $p < 0.05$ .

Estos valores se establecieron para clasificar las plantas en tres categorías principales:  $CI < 1.5$  y  $WL < 9$  %: plantas que producen frutos tolerantes a bajas temperaturas (T);  $1.5 < CI < 2.5$  y  $9 < WL < 11$  %: plantas que producen frutos parcialmente tolerantes (PT);  $CI > 2.5$  y  $WL > 11$  %: plantas que producen frutos sensibles al estrés por frío (S). En la campaña del año 2019, en el cruce N×N, el 44.8 % de las plantas se clasificaron como tolerantes, 34.5 % como parcialmente tolerantes y 20.7 % como sensibles. Mientras que en el cruce S×S se obtuvieron unas proporciones de 5.5, 16.7 y 77.8 % de plantas T, PT y S, respectivamente (Fig.V.2A). Tras cosechar y evaluar las 134 plantas de la población segregante N×S se clasificaron 19 % como tolerantes, 38.8 % parcialmente tolerantes y 42.2 % como sensibles (Fig.V.2A).

En el experimento llevado a cabo en la primavera de 2021 las condiciones ambientales cambiaron respecto a las del primer ensayo, por lo que se volvieron a evaluar los híbridos comerciales “Natura” y “Sinatra” para poder establecer una nueva clasificación. Los índices de daños por frío se mantuvieron, sin embargo, se produjo un importante descenso en la pérdida de peso, por lo que las plantas que produjeron frutos con  $CI < 1.5$  y  $WL < 6.5$  % (parámetros obtenidos en N) se clasificaron como tolerantes (T), para  $1.5 < CI < 2.5$  y  $6.5 < WL < 8.5$  % fueron clasificados como parcialmente tolerantes (PT) y para  $CI > 2.5$  y  $WL > 8.5$  % como sensibles (S). El comportamiento postcosecha de S y N fue muy similar al de la primera evaluación. Sin embargo, el comportamiento de las 180 plantas del cruce N×S fue ligeramente diferente, presentando 25.3 % plantas-T, 51.2 % plantas-PT y 23.6 % plantas-S. La ratio de segregación (1:2:1) para la tolerancia al frío en el cruce parece indicar que se trata de un carácter semi-dominante ( $\chi^2=0.2$ ,  $p=0.91$ ).

La figura V.2C muestra el PCA de los datos obtenidos de la primera campaña, visualizando las diferencias en CI y WL en las poblaciones estudiadas. Natura y N×N aparecen claramente separados en el gráfico, siendo los únicos grupos localizados en la parte izquierda. Por ello, se remarca la importancia de WL (PC1) en la separación, ya que explica cerca del 80 % de la

variación. La figura V.2A también muestra dicha agrupación para el autocruzamiento de Natura. Por otra parte, S y S×S se agruparon juntos en la parte derecha del gráfico, presentando valores altos de CI y WL. N×S se agrupó en el medio del gráfico del PCA, explicando perfectamente la segregación fenotípica del carácter. Los datos obtenidos en la segunda campaña también se analizaron por PCA (Fig.V.2D), mostrando una distribución similar de los diferentes grupos analizados, y demostrando de nuevo la importancia de la pérdida de peso en la explicación de la variación del análisis (85.8 %).

Teniendo en cuenta la importancia que ha mostrado el ácido abscísico (ABA) en estudios previos para la tolerancia al frío del fruto de calabacín, se midió el contenido en esta hormona para evaluar la influencia sobre la tolerancia en nuestra población segregante. Con ello se observó una importante correlación entre ABA y WL, mostrando un coeficiente de correlación ( $r = -0.756$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig.V.3).

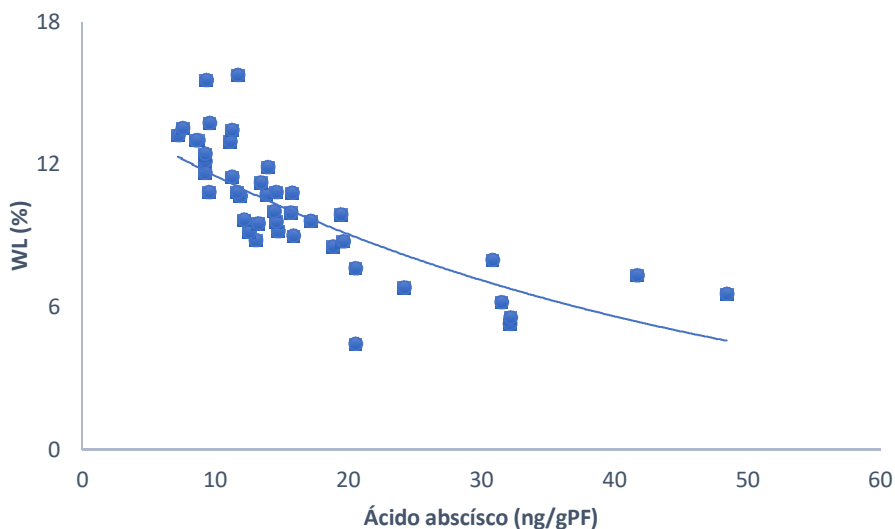


**Fig.V.3:** Correlación entre contenido en ABA (ng/gPF) y WL (%), mostrando una media por planta de contenido de ABA en frutos tras 5 días de almacenamiento en frío.

### ***V.2.2. Implicación de QTLs en la tolerancia al frío durante el periodo postcosecha del fruto de calabacín***

Un análisis “Bulk-segregant” (BSAseq), junto con estrategias de resecuenciación del genoma completo (WGR), nos permitieron identificar dos QTLs mayoritarios, que controlan la tolerancia al frío en frutos de calabacín. Dichos QTLs se localizan en el cromosoma 5 y en el 18. Catorce plantas para cada fenotipo extremo se seleccionaron del cruce N×S, para generar los bulk tolerante (T-bulk) y sensible (S-bulk). Esta construcción de los bulks se ha representado gráficamente en la figura V.4.

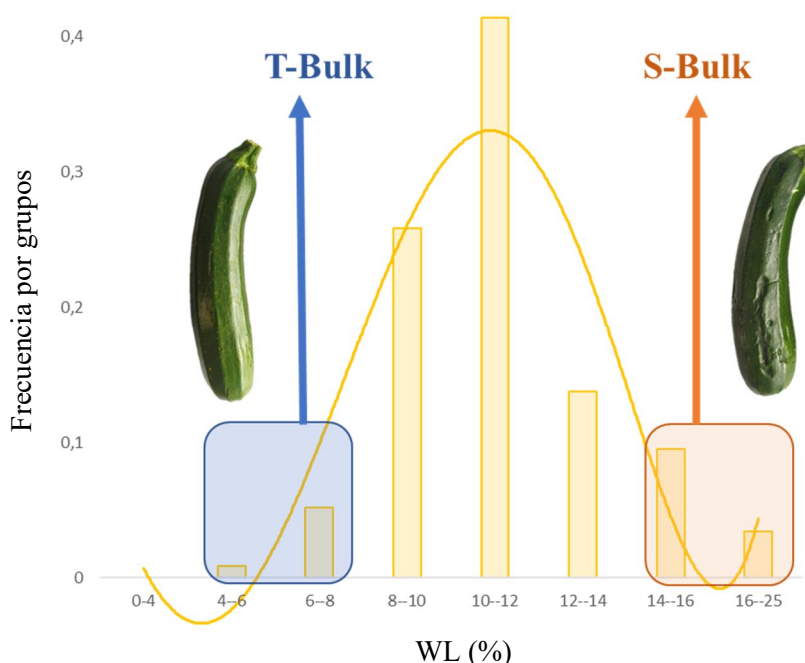


**Fig.V.4:** Frecuencia de plantas, distribuidas por porcentaje de pérdida de peso de los frutos producidos por cada planta individual en la población segregante tras 14 días de almacenamiento en frío. Generación de T-bulk y S-bulk con las plantas que presentaron valores extremos para % WL.

Ambos bulks, junto con los preparados para los parentales Sinatra y Natura, fueron resecuenciados. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con 107.948.382 lecturas (150 bp) del S-bulk (profundidad media 47.08 y 98.24 % de genoma mapeado) y 106.359.778 lecturas (150 bp) del T-

bulk (45.86 profundidad media y 98.10 % genoma mapeado) (Tabla V.1). Las lecturas fueron mapeadas comparándolas contra el genoma *Cucurbita pepo* v4.1 y el análisis de polimorfismos “SNP calling” dio como resultado 353262 SNPs en S-bulk y 356444 en T-bulk.

**Tabla V.1:** Resumen de datos de secuenciación y alineamiento.

| Muestra | Lecturas<br>totales | Lecturas<br>mapeadas | Q30(%) | Tasa de<br>mapeo<br>(%) | Profundidad<br>media (X) | Covertura<br>al menos<br>4X (%) | Nº de<br>SNPs |
|---------|---------------------|----------------------|--------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------|
| S-Bulk  | 107,948,382         | 106,044,578          | 91.53  | 98.24                   | 47.08                    | 96.33                           | 353262        |
| T-Bulk  | 106,359,778         | 104,340,601          | 92.15  | 98.10                   | 45.86                    | 96.27                           | 356444        |
| Sinatra | 103,762,872         | 102,128,766          | 91.23  | 98.43                   | 46.19                    | 96.04                           | 301957        |
| Natura  | 119,594,626         | 117,724,299          | 91.42  | 98.44                   | 50.69                    | 95.93                           | 310604        |

Los datos de SNP-index resultantes de S- y T-bulk se utilizaron para generar una gráfica de cada cromosoma de *C. pepo* (Fig.V.5). Como se esperaba, las gráficas de SNP-index mostraron que la mayoría de las regiones genómicas no fueron relevantes para el rasgo de tolerancia al frío, siendo la mayoría de sus SNPs distribuidos aleatoriamente alrededor de 0.5, por lo que al calcular el ( $\Delta$  SNP-index), que es la diferencia entre el SNP-index de ambos bulks, el resultado es cercano a 0. Sin embargo, el  $\Delta$  SNP-index muestra una región en el cromosoma 5 y otra en el 18 con diferencias significativas, por lo que ambos bulks tienen una contribución diferencial para los parentales Sinatra y Natura (Fig.V.6). La región localizada en el cromosoma 5 abarcó 264 Kb, desde la posición 7191663 a la 7455664, mostrando un  $\Delta$  SNP-index de -0.39. Resultados similares se hallaron en la región identificada en el cromosoma 18. Esta región comprende desde la posición 6332494 a 6694248, con una longitud total de 362 Kb, donde el  $\Delta$  SNP-index fue -0.4.

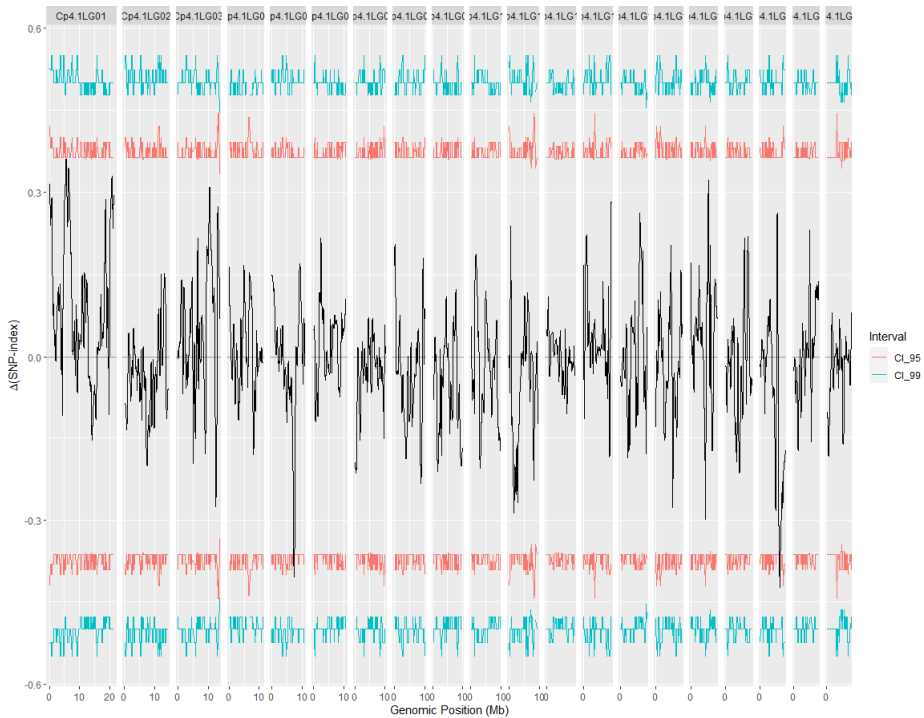


**Fig.V.5:** Gráfica de delta SNP-index obtenida de sustraerle el T-bulk SNP index al S-bulk SNP-index. Los intervalos de confianza estadística bajo la hipótesis nula de no QTL se muestran en rojo ( $p < 0.05$ ) y azul ( $p < 0.01$ ).

Tras estudiar los SNP correspondientes a cada haplotipo, en S- y T-bulks, se encontró que la mayoría de haplotipos en las regiones candidatas corresponden a Sinatra en S-bulk y a Natura en T-bulk. Valores de  $\Delta$  SNP-index diferentes de 0 corresponden a posibles SNPs responsables del fenotipo. Se determina un QTL cuando los SNPs de una determinada región alcanzan un nivel de confianza del 95%. Estos resultados indicaron que había dos QTLs mayoritarios relacionados con la tolerancia al frío en frutos, uno de ellos en el cromosoma 5 (QTL5) y otro en el 18 (QTL18).

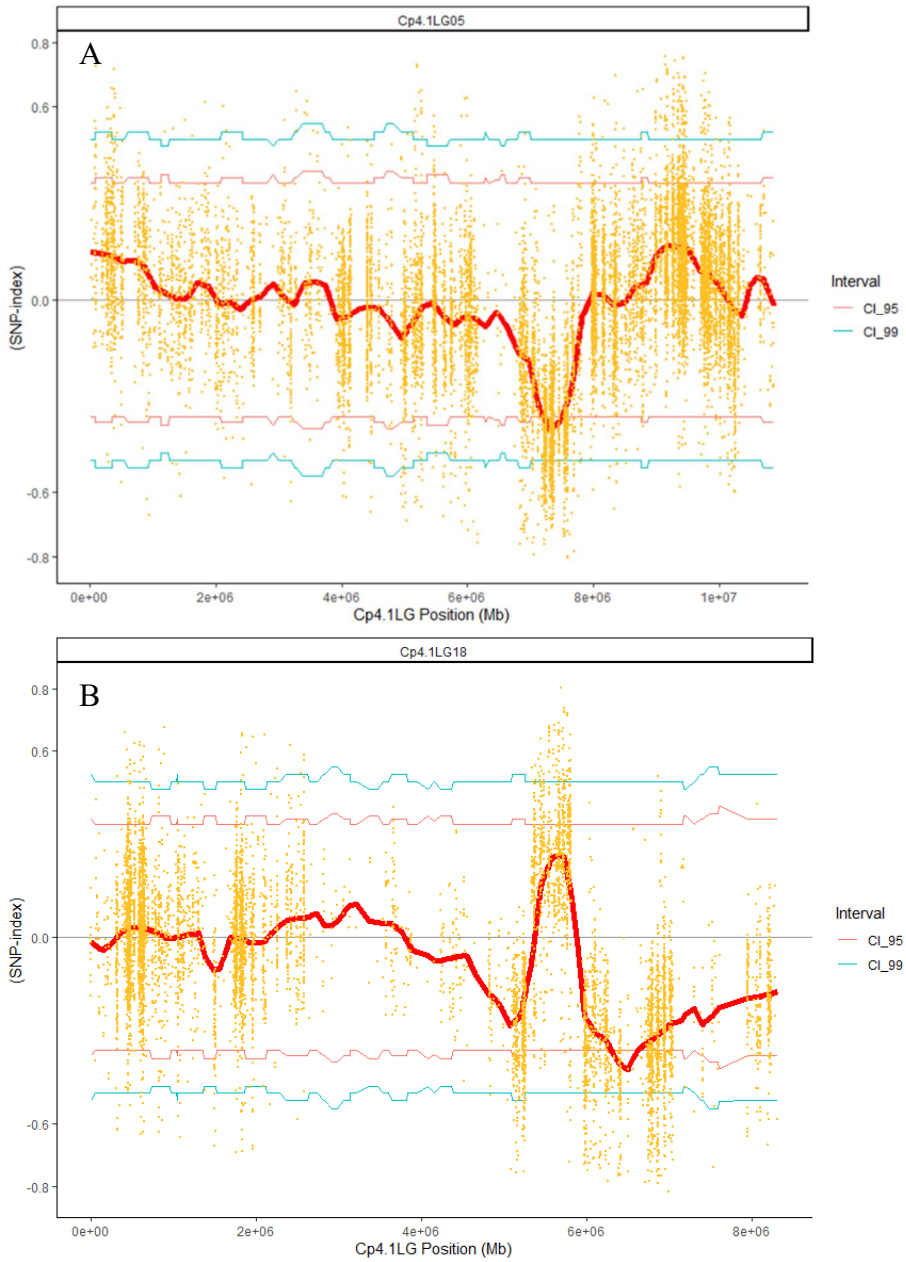


**Fig.V.6:** Gráficas de  $\Delta(\text{SNP-index})$  para los cromosomas 5 (A) y 18 (B), observándose un QTL candidato para cada uno, donde el  $\Delta(\text{SNP-index})$  estaba por encima del valor de confianza ( $p < 0.05$ ). Se muestra el  $\Delta(\text{SNP-index})$  y los intervalos de confianza estadística bajo la hipótesis nula de no QTL (rojo,  $p < 0.05$ ; azul,  $p < 0.01$ ).

### ***V.2.3. Validación de los QTLs por análisis de cosegregación***

Un análisis de cosegregación se llevó a cabo en dos poblaciones segregantes diferentes del cruce N×S. Para ello, 4 SNPs para QTL5 y 2 SNPs para el QTL18 se utilizaron para diseñar marcadores mediante “KASP assays”, una técnica que se basa en generar dos cebadores con la misma secuencia, pero cambiando el SNP, para poder identificar si la planta presenta en su ADN estos QTLs o no. Todos los marcadores del QTL5 cosegregaron con el fenotipo tolerante en la población, y fueron transmitidos juntos, encontrando resultados similares en aquellos diseñados para el QTL18 (Fig.V.7). En ambos QTLs Natura fue heterocigoto (+ -), mientras que Sinatra presentó un genotipo homocigoto (- -) para todos los marcadores analizados. Los datos fenotípicos (WL y CI) de cada planta individual se utilizaron para confirmar si la presencia de estos marcadores estaba asociada con el fenotipo de tolerancia al frío. La figura V.7A muestra la clasificación de las plantas basadas en el genotipo para QTL5: homocigoto tolerante (+ +), heterocigoto (+ -) o homocigoto sensible (- -). Cada barra representa la proporción de plantas tolerantes, parcialmente tolerantes y sensibles en cada genotipo. El 83.3 % de las plantas del grupo homocigoto tolerante (+ +) produjeron frutos tolerantes al estrés por frío, en el grupo heterocigoto (+ -) el 51.6% de las plantas se asignaron como tolerantes, teniendo una proporción mucho mayor que de sensibles (21 %). Finalmente, como se esperaba, en el grupo homocigoto sensible (- -), sólo el 12.5% de las plantas se clasificaron como tolerantes. La figura V.7B muestra resultados similares para el QTL18, presentando 75, 51, y 20.5 % de plantas tolerantes para los genotipos (+ +), (+ -), y (- -), respectivamente. Diferentes genotipos de ambos QTLs se han representado juntos para estudiar la influencia de cada QTL individualmente y el posible efecto aditivo en la tolerancia al frío durante la postcosecha. Para reducir el número de grupos, como Natura (parental tolerante) es heterocigoto, para QTL5 los individuos (+ +) y (+ -) se consideraron como +5, y el homocigoto (- -) como -5, el mismo criterio se utilizó para el QTL18, obteniendo por tanto cuatro grupos: “+5 +18”; “+5 -18”; “-5+18”; y “-5 -18” (Fig.V.7C).

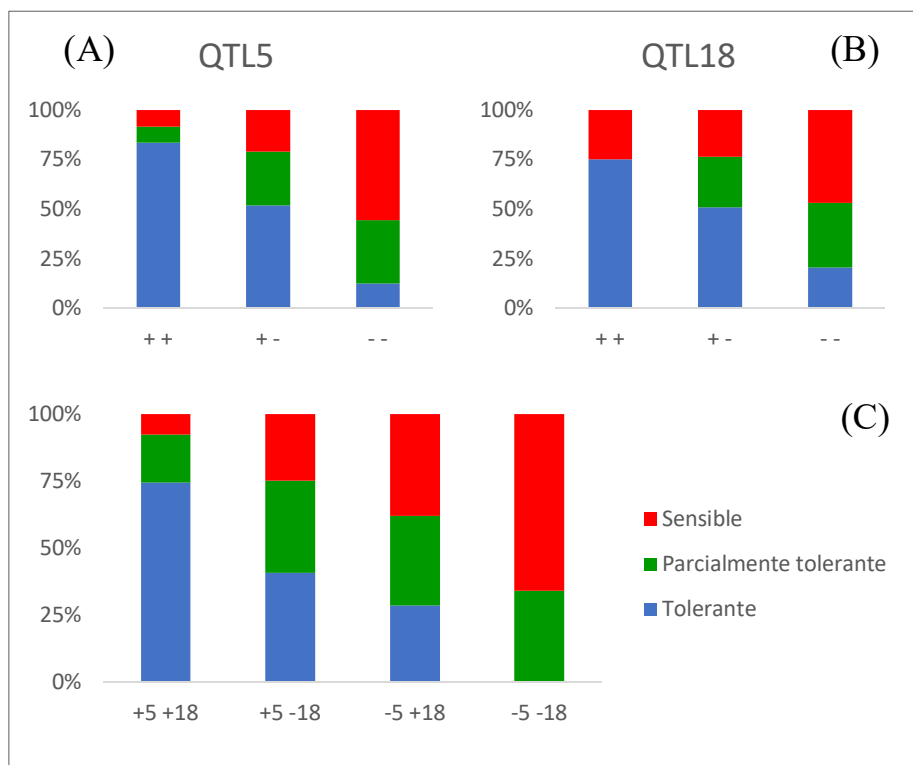


**Fig.V.7:** Porcentaje de plantas clasificadas como sensibles (rojo), parcialmente tolerantes (verde) y tolerantes (azul), agrupadas por QTL5 (A), QTL18 (B), o por la combinación de ambos (C).

Dentro de las plantas que presentan en su genoma ambos QTLs (+5+18), se detectaron un 74.4 % de tolerantes y un 7.7 % de plantas sensibles, el grupo +5-18 contiene 40.6 y 25 % de plantas tolerantes y sensibles, respectivamente, mientras que el -5+18 contiene 28.5 % de tolerantes y 38.1 % de sensibles. Estos resultados sugieren que el QTL5 tiene una mayor influencia en el control de la tolerancia al frío (Fig.V.7C). Finalmente, en el grupo que no presentaba ninguno de los QTLs (-5-18) el 66 % de las plantas fueron sensibles y el 34 % parcialmente tolerantes, no encontrándose ninguna planta tolerante dentro de este grupo. Teniendo en cuenta estos resultados podemos observar una contribución aditiva de ambos QTLs en la regulación de este carácter.

El análisis de componentes principales (PCA) integra los datos de pérdida de peso y daños por frío con el genotipo obtenido en el análisis de

marcadores para ambos QTLs, independientemente (Fig.V.8). Las plantas (+ +) y (+ -) para el QTL5, el haplotipo Natura que parece conferir la tolerancia, se agruparon juntos en la parte izquierda del gráfico y se separaron significativamente de las plantas homocigotas sensibles (- -), haplotipo Sinatra. Resultados similares se encontraron para el QTL18. Para evaluar las diferencias significativas entre los grupos detallados previamente (“+5 +18”; “+5 -18”; “-5+18”; y “-5 -18”) se realizó un PCA adicional con la combinación del análisis fenotípico y de marcadores integrando ambos QTLs. Las plantas que no presentaron ninguna de las regiones de interés para la tolerancia al frío (-5-18) se agruparon en la parte derecha del gráfico, asociado con unos índices elevados de WL y CI. Por otra parte, las plantas que contenían ambas regiones (+5+18) se agruparon en la parte izquierda del gráfico, asociado con una alta tolerancia al frío. +5-18 y -5+18 se separaron significativamente del grupo -5-18, lo que indica que la influencia de cada región, independientemente, mejora la tolerancia al frío en los frutos, no encontrándose además diferencias significativas entre los grupos +5+18 y +5-18, lo que sugirió una mayor contribución de la región correspondiente al cromosoma 5 en la tolerancia al frío.

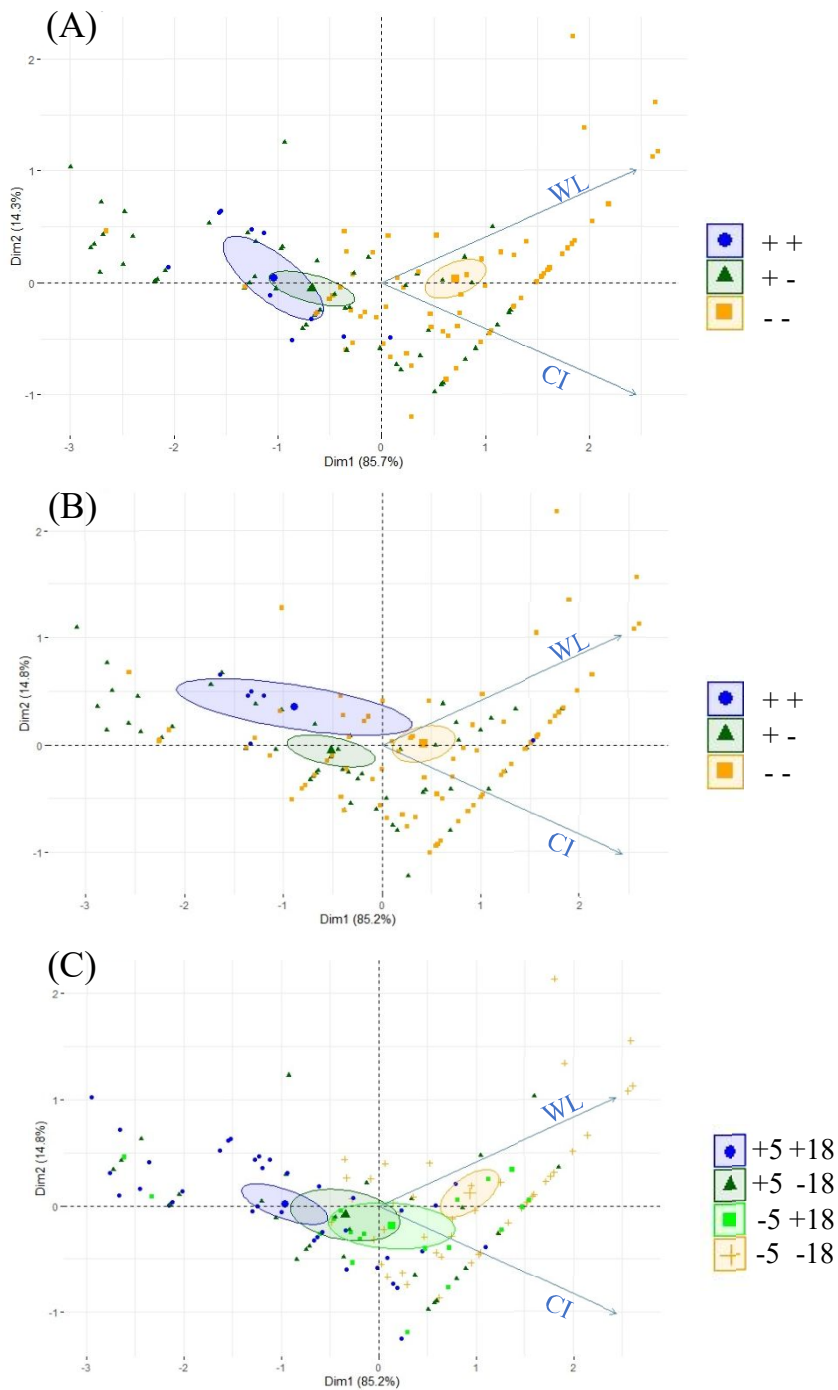


**Fig.V.8:** PCA del análisis de marcadores de ambos QTLs, independientemente para QTL5 (A), QTL18 (B) y combinación de ambos (C), integrando los parámetros de WL y CI de cada planta individual con su genotipo.

***V.2.4. Análisis de las regiones genómicas identificadas:  
Distribución de SNP y posibles genes candidatos***

La región genómica de 264 Kb en el QTL5 contiene 31 genes anotados, y la de 362 Kb del QTL18 contiene 75. Se llevó a cabo un estudio para averiguar si la función de estos genes estaba relacionada con la tolerancia al frío durante el periodo postcosecha. De entre los genes identificados seleccionamos una lista de posibles genes candidatos en calabacín (Tabla V.2). Entre las diferentes funciones descritas en la tabla V.2, estas regiones contienen 6 gen IDs codificando para las enzimas pectinesterasa, lipasa, diacilglicerol quinasa, y xiloglucano endotransglicosidasa/hidrolasa, involucradas en composición, remodelado y degradación de la pared celular. Por otro lado, 8 gen IDs se han relacionado con la regulación de biosíntesis y señalización de hormonas como ABA, jasmonatos, etileno, giberelinas y poliaminas (Tabla V.2). Además, investigamos la localización de la variante dentro del gen, y el impacto que ello supone, en 197 SNPs en QTL5 y 857 SNPs en QTL18. Estas variantes se encontraron distribuidas en S- y T-bulks como se esperaba de acuerdo a los fenotipos de los parentales, y la manera de pasar dicho rasgo a la descendencia. 7 de los SNPs en el QTL5 fueron exónicos, y 2 de ellos causaron cambios no sinónimos localizados en las secuencias codificantes del gen Cp4.1LG05g10710, que codifica para una proteína transmembrana involucrada en respuestas a estrés abiótico en Arabidopsis (Luhua et al., 2013) (Tabla V.3). Por otra parte, 82 SNPs se localizaron en regiones exónicas en QTL18, siendo 32 de ellas mutaciones “missense” que podrían dar lugar a proteínas truncadas. 3 de los SNPs en Cp4.1LG18g05920, que codifica para una proteína perteneciente con función de canal catiónico regulado por nucleótidos cíclicos, involucrado en respuesta a estrés biótico y abiótico por transportadores de cationes, y 1 SNP en Cp4.1LG18g06520, que codifica para la familia de proteínas de glutarredoxinas, cuya función es controlar el mantenimiento de la homeostasis redox en la célula (Tabla V.2).

**Tabla V.2:** Genes candidatos localizados en QTL5 y QTL18 para la tolerancia al frío en el fruto de calabacín. Los genes que aparecen en negrita son aquellos con SNPs en la región del gen, y si están en la región exónica, provocando un cambio “missense”, el gen aparece en rojo.

| Gen_ID                 | Anotación                                                             | Función                                                                                 | Referencias                                 |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>QTL5</b>            |                                                                       |                                                                                         |                                             |
| <b>Cp4.1LG05g10710</b> | <b>Proteína transmembrana (2)</b>                                     | Estrés abiótico en Arabidopsis                                                          | (Luhua et al., 2013)                        |
| <b>Cp4.1LG05g10830</b> | <b>Pectinesterasa</b>                                                 | Degradación de la pared celular                                                         | (Brown et al., 2021; Wu et al., 2018)       |
| Cp4.1LG05g10870        | Lipasa, GDSL                                                          | Desarrollo de la cutícula                                                               | (Aparato and Suh, 2022; Jiang et al., 2021) |
| Cp4.1LG05g10930        | Shikimato quinasa                                                     | Promueve la ruta de fenilpropanoides                                                    | (Wang et al., 2021)                         |
| Cp4.1LG05g10950        | Dehidroquinato deshidratasa/ shikimato deshidrogenasa                 | Promueve la ruta de fenilpropanoides                                                    | (Jannatizadeh, 2019; Sun et al., 2020)      |
| Cp4.1LG05g10920        | Pequeña GTPasa de superfamilia Ras                                    | Regula el movimiento estomático frente a estrés por sequía mediante interacción con ABA | (Chen et al., 2021)                         |
| Cp4.1LG05g10840        | Violaxantina deepoxidasa                                              | Regula la biosíntesis de ABA                                                            | (Li et al., 2013)                           |
| Cp4.1LG05g10880        | Familia de proteína de repeticiones beta-transducina, repetición WD40 | Modula la respuesta de ABA frente a estrés en planta de Arabidopsis                     | (Xu et al., 2019)                           |
| Cp4.1LG05g10890        | Transportador mitocondrial de S-adenosilmetionina                     | Funcionamiento celular, tolerancia al frío a través de poliaminas, etileno y ABA        | (Menga et al., 2017; Palmieri et al., 2006) |
| Cp4.1LG05g10850        | Factor de transcripción WRKY                                          | Tolerancia al frío por interacción con giberelinas y ácido jasmónico                    | (Sun and Yu, 2015; Tang et al., 2022)       |
| Cp4.1LG05g11000        | Alcohol deshidrogenasa                                                | Involucrado en repuesta a estrés por frío                                               | (Davik et al., 2013; Su et al., 2020)       |
| <b>Cp4.1LG05g11080</b> | <b>Transducina/WD40</b>                                               | Modula la respuesta de ABA frente a estrés en planta de Arabidopsis                     | (Xu et al., 2019)                           |
| <b>Cp4.1LG05g11010</b> | <b>Factor de transcripción Hélice-bucle-hélice básica</b>             | Regulación de la tolerancia al frío                                                     | (Shan et al., 2019; Xu et al., 2014)        |
| <b>Cp4.1LG05g11200</b> | <b>Patatin</b>                                                        | Metabolismo lipídico en respuesta a bajas temperaturas                                  | (Kong et al., 2019; Scherer et al., 2010)   |

| QTL18           |                                                       |                                                                                                    |                                              |
|-----------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Cp4.1LG18g05960 | WAX2                                                  | Involucrado en la producción de ceras                                                              | (Carvajal et al., 2021)                      |
| Cp4.1LG18g06060 | Proteína con repeticiones de anquirina                | Regula la biosíntesis de etileno                                                                   | (Lyzenga et al., 2012)                       |
| Cp4.1LG18g05920 | Canal catiónico regulado por nucleótidos cíclicos (3) | Respuesta a estrés biótico y abiótico a través de transportadores de cationes                      | (Jha et al., 2016)                           |
| Cp4.1LG18g05930 | Diacilglicerol quinasa                                | Cataliza la conversión de triacilglicerol a ácido fosfatídico modulando la estabilidad de membrana | (Tan et al., 2018)                           |
| Cp4.1LG18g06010 | Receptor de glutamato                                 | Incrementa la tolerancia al frío regulando la señalización de jasmonato                            | (Zheng et al., 2018)                         |
| Cp4.1LG18g06080 | Glicosiltransferasa                                   | Promueve la ruta de fenilpropanoides                                                               | (Yamazaki et al., 2021)                      |
| Cp4.1LG18g06220 | Factor de transcripción Myb 68                        | Respuesta a aclimatación al frío                                                                   |                                              |
| Cp4.1LG18g06100 | Proteína de unión a calmodulina                       | Mejora la Resistencia al frío, regulación del metabolismo energético y del GABA.                   | (Xie et al., 2021; Yu et al., 2021)          |
| Cp4.1LG18g06250 | Xiloglucano endotransglicosidasa/hidrolasa            |                                                                                                    |                                              |
| Cp4.1LG18g06260 | Xiloglucano endotransglicosidasa/hidrolasa            | Degradación de la pared celular                                                                    | (Takahashi et al., 2021; Zhai et al., 2021)  |
| Cp4.1LG18g06180 | Xiloglucano endotransglicosidasa/hidrolasa            |                                                                                                    |                                              |
| Cp4.1LG18g06380 | Factor de transcripción Hélice-bucle-hélice básica    | Tolerancia al frío y a la sequía                                                                   | (Jiang et al., 2019; Soleimani et al., 2022) |
| Cp4.1LG18g06510 | Familia de proteínas de glutarredoxinas               | Mantenimiento celular de la homeostasis redox                                                      | (Hu et al., 2015)                            |
| Cp4.1LG18g06520 | Familia de proteínas de glutarredoxinas               |                                                                                                    |                                              |
| Cp4.1LG18g06740 | Arginina decarboxilasa                                | Involucrado en la biosíntesis de poliaminas                                                        | (Hou et al., 2023; Palma et al., 2014a)      |

**Tabla V.3:** Localización e impacto funcional de las variantes de SNP localizadas en las regiones de QTL5 y QTL18.

|                       | <b>Variante</b>                                       | <b>QTL5</b> | <b>QTL18</b> |
|-----------------------|-------------------------------------------------------|-------------|--------------|
| Región del gen        | Exón                                                  | 7           | 82           |
|                       | Intron                                                | 110         | 161          |
|                       | Intergénico                                           | 21          | 51           |
|                       | Región de empalme                                     | 0           | 2            |
|                       | 5' - y 3' - UTR                                       | 3           | 79           |
|                       | Zona abajo y arriba de la codificante (Down-UpStream) | 56          | 482          |
| Cambio en la proteína | Missense (Aminoácido por otro)                        | 2           | 32           |
|                       | Nonsense (Terminación)                                | 0           | 0            |
|                       | Silenciosa                                            | 5           | 50           |
| Impacto               | Alto                                                  | 0           | 0            |
|                       | Moderado                                              | 2           | 32           |
|                       | Bajo                                                  | 5           | 56           |
|                       | Modifica                                              | 169         | 718          |

### **V.3 Discusión**

La aparición de daños por frío en el fruto de calabacín representa uno de los problemas más importantes para el sector agrícola de este cultivo, como se ha detallado en los capítulos anteriores. Además de desarrollar tratamientos que se puedan aplicar al fruto, con el objetivo de reducir este desorden fisiológico, y de comprender la función que desempeñan determinados metabolitos en la regulación de este fenómeno, es de vital importancia descubrir las regiones genómicas que están ligadas a esta tolerancia al frío.

La tolerancia al frío en fruto de calabacín es un mecanismo muy complejo, que se debe a la interacción de una amplia variedad de factores, por ello es lógico que sea dependiente de variedad, ya que cada variedad posee un fondo genético diferente que determina el carácter fenotípico del fruto, haciendo que se comporten de diferente manera frente a este estrés y dando lugar a mayores o menores porcentajes de pérdida de peso, índices de daños por frío, contenido en peróxido de hidrógeno o peroxidación lipídica, entre otros (Carvajal et al., 2011). Comparando dos variedades comerciales que son contrastantes para la tolerancia al frío, se han descrito rutas metabólicas implicadas en los mecanismos de tolerancia al frío como el metabolismo de las poliaminas, acumulación de prolina y catabolismo del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Palma et al., 2014a), cambios en el contenido en carbohidratos y ácidos orgánicos (Palma et al., 2014b), inducción de la síntesis de ABA en la variedad tolerante al frío (Carvajal et al., 2017), así como en la producción de ceras cuticulares en esta variedad (Carvajal et al., 2021). Sin embargo, la implicación de la variabilidad genética que existe entre estas dos variedades aún no se ha estudiado, por ello en este trabajo se realizó una secuenciación (WGR) del genoma de ambas variedades y se utilizó para un estudio de análisis de bulk segregantes (BSA), con el objetivo de encontrar las regiones genómicas más importantes en la tolerancia al frío, como ya se ha hecho en otros frutos como tomate o calabaza (Ohshima et al., 2017; Ramos et al., 2020).

Debido a los múltiples factores que regulan este rasgo fenotípico se obtuvo una elevada dispersión en la población segregante del cruce Natura×Sinatra, tanto en la campaña de 2019 como en la de 2021, mientras que los demás grupos mostraron un comportamiento más uniforme, lo que hizo que se separaran perfectamente entre ellos, siendo el porcentaje de pérdida de peso el componente que más importante en la separación. Por ello éste fue el parámetro que se utilizó para comparar la producción de ABA tras cinco días de almacenamiento, con frutos de la misma planta individual, observándose una clara correlación negativa entre producción de ABA y porcentaje de pérdida de peso, remarcando la importancia de la producción endógena de esta fitohormona en la tolerancia al frío, como ya se había demostrado en estudios previos con aplicación exógena en frutos de calabacín (Carvajal et al., 2017; Castro-Cegri et al., 2023b, 2023a).

Tras realizar el BSAsseq se identificaron 2 QTLs mayoritarios, localizados en el cromosoma 5 y en el 18. Para validar dichos QTLs se llevó a cabo un análisis de cosegregación, en el que se analizaron marcadores diseñados para cada QTL y el fenotipo que mostró cada planta individualmente, obteniendo como resultado que muy pocas plantas con los dos QTLs produjeron frutos sensibles al frío, mientras que, si no presentaban ninguno de los dos, la mayoría de ellas produjeron frutos sensibles, no encontrándose ninguna planta que produjera frutos tolerantes en este grupo. Cuando se analizó por separado cada uno de ellos se observó un efecto menor, por lo que hay una contribución aditiva en este carácter. Este resultado es el esperado para un rasgo fenotípico que se debe a múltiples factores, lo que hace que cada QTL pueda aportar de una manera sumatoria, como ya se ha descrito en frutos de melón, melocotón o tomate (Harel-Beja et al., 2010; Pereira et al., 2021; Quilot et al., 2004). Una vez se confirmó la implicación de las regiones identificadas en la tolerancia al frío se analizaron los posibles genes candidatos a contribuir a este fenotipo, así como las modificaciones que algunos de ellos podrían sufrir debido a los SNPs presentes en su región.

La cutícula del fruto es la primera barrera que, debido a su composición lipídica, no solo previene de la deshidratación, sino que también ofrece protección frente estreses bióticos y abióticos (Domínguez et al., 2011), habiéndose probado que la composición de ceras cuticulares es de una elevada importancia en el fruto de calabacín, entre otros por el incremento en la actividad del gen WAX 2 (CER3) (Carvajal et al., 2021), gen que además de encontrarse en la región identificada del QTL18, posee cambios de SNPs en su secuencia comparando ambas variedades. Además de este gen se han encontrado otros relacionados con cutícula, un gen que codifica para diacilglicerol quinasa, que cataliza la conversión de triacilglicerol a ácido fosfatídico modulando la estabilidad de membrana (Tan et al., 2018), y 3 genes que codifican para xiloglucano endotransglicosidasa/hidrolasa, enzima que se encontró sobreexpresada durante el tratamiento de aclimatación al frío (Le et al., 2015), y se utilizó para generar mutantes de *Arabidopsis XTH19*, mostrando una reducida tolerancia a las bajas temperaturas comparado con el fenotipo salvaje, debido a cambios en la estructura y composición de la pared celular (Takahashi et al., 2021). Además, se han identificado los genes que codifican para esta enzima, asociándolos al ablandamiento de cereza (Zhai et al., 2021). En QTL5, se encontraron genes que codificaban para enzimas como pectinesterasa, para la degradación de la pared celular (Wu et al., 2018) y asociado a QTLs de otras especies frente a estrés por bajas temperaturas (Brown et al., 2021), lipasa (GDSL), involucrado en el desarrollo de la cutícula (Aparato and Suh, 2022; Jiang et al., 2021) o patatin, relacionado con el metabolismo lipídico frente a estreses abióticos (Scherer et al., 2010).

Analizando los genes candidatos también se encontró una proporción elevada de ellos que codifican para enzimas relacionadas con regulación hormonal, siendo especialmente significativo el número de genes que están involucrados con el ácido abscísico en el QTL5, que regula la biosíntesis de ABA (Li et al., 2013), dos genes que codifican para transducina/WD40, uno de ellos con cambio de SNP en su región, que modulan la respuesta mediada por

ABA frente a estrés (Xu et al., 2019), y pequeña GTPasa de superfamilia Ras, que regula los movimientos estomáticos frente a estrés por deshidratación mediante interacción con ABA (Chen et al., 2021). Además en ambos QTLs se encontraron genes relacionados con etileno, como un transportador mitocondrial de S-adenosilmetionina en QTL5, que regula la entrada de S-adenosilmetionina en la mitocondria y la hipometilación de ADN mitocondrial, regulando el ciclo de la metionina, etileno y poliaminas, y con todo ello la tolerancia al frío (Menga et al., 2017; Palmieri et al., 2006), o como una proteína con repeticiones de anquirina, en QTL18, que regula la síntesis de etileno, mediando la degradación de la enzima de biosíntesis de etileno, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintasa (Lyzenga et al., 2012). También se encontraron en estas regiones genes relacionados con jasmónico, como el factor de transcripción WRKY, que regula tolerancia al frío por interacción entre giberelinas y jasmónico (Sun and Yu, 2015; Tang et al., 2022), en QTL5, o receptor de glutamato, que incrementa la tolerancia al frío regulando la señalización de jasmónico (Zheng et al., 2018).

Se ha puesto previamente de manifiesto la importancia de la ruta de los fenilpropanoides en la tolerancia al frío de cucurbitáceas (Castro-Cegri et al., 2023b; Wang et al., 2021), por ello podría ser importante que en el QTL5 se encuentren los dos genes principales para la acumulación de ácido shikímico, shikimato quimasa y dehidroquinato dehidratasa / shikimato dehidrogenasa, metabolito directamente involucrado en dicha ruta, que podría ser clave para la adquisición de tolerancia al frío.

Finalmente, en QTL18 se encontraron genes que codifican para enzimas relacionadas con la síntesis de metabolitos, que ya se han demostrado previamente con una elevada importancia en la adquisición de tolerancia al frío en los frutos “Natura”, como son arginina decarboxilasa, involucrado en la biosíntesis de poliaminas (Hou et al., 2023; Palma et al., 2014a) y una proteína de unión a calmodulina, relacionado con la mejora de tolerancia al frío mediante

regulación del metabolismo energético y GABA (Palma et al., 2019; Xie et al., 2021; Yu et al., 2021).

## **5. CONCLUSIONES**

*Conclusions*



1. Dextrin was the most effective between the polysaccharide-based coatings tested, in maintaining the postharvest quality of zucchini fruit. The addition of oleuropein and olive oil to the dextrin resulted in a higher induction of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense, being the best treatment the dextrin coating with olive oil.
2. Absciscic acid (ABA) enhances cold tolerance in zucchini fruit. This response is due to modulation of primary metabolism, inducing the accumulation of key amino acids, and of secondary metabolism, with an increment in t-zeatin and riboflavin at the beginning of cold storage period.
3. ABA treatment also increases the chilling tolerance of zucchini by regulating the antioxidant capacity of the fruit on the first day of cold storage, inducing the accumulation of non-enzymatic antioxidants like ascorbate, carotenoids and phenolic compounds. These results carry a concomitant increment of the nutraceutical properties of the fruit.
4. Exogenous riboflavin could be effectively used as a GRAS compound to maintain the postharvest quality of zucchini fruit during cold stress. This treatment reduced weight loss and chilling injury, and maintained the membrane stability, modifying the liposoluble fraction and activating the phenylpropanoid pathway.
5. The genome wide association study done in two zucchini varieties with contrasting degree of chilling sensitivity uncovered 2 quantitative trait loci (QTLs) involved in cold tolerance, one in chromosome 5 and the other in chromosome 18. Some of the genes belonging to these loci were identified as putative candidates for chilling tolerance in zucchini fruit. Thus, KASP markers designed for each region can be used in future genetic improvement programs.

1. Dextrina fue la más efectiva de entre las cubiertas polisacáridicas probadas en el mantenimiento de la calidad postcosecha del fruto de calabacín. La adición de oleuropeína y aceite de oliva a la cubierta de dextrina resultó en una mayor inducción de la defensa antioxidante enzimática y no enzimática, resultando ser la cubierta de dextrina combinada con aceite de oliva la más efectiva.
2. Ácido abscísico (ABA) mejora la tolerancia al frío en fruto de calabacín. Esta respuesta se debe a la modulación del metabolismo primario, induciendo la acumulación de aminoácidos clave, y del metabolismo secundario, con un incremento en t-zeatina y riboflavina al inicio del periodo de almacenamiento en frío.
3. El tratamiento con ABA también incrementa la tolerancia al frío en calabacín mediante la regulación de la capacidad antioxidante del fruto en el primer día de almacenamiento a bajas temperaturas, induciendo la acumulación de antioxidantes no enzimáticos como ascorbato, carotenoides y compuestos fenólicos. Estos resultados dan lugar por tanto a un concomitante incremento de las propiedades nutracéuticas del fruto.
4. Riboflavina exógena podría ser efectivamente usada, ya que es un compuesto GRAS, para mantener la calidad postcosecha del fruto de calabacín durante la exposición a estrés por frío. Este tratamiento redujo la pérdida de peso y los daños por frío, así como mantuvo la estabilidad de membrana, modificando la fracción liposoluble y activando la ruta de fenilpropanoides.
5. El estudio de asociación del genoma completo, realizado en dos variedades de calabacín con un grado contrastante de sensibilidad a las bajas temperaturas reveló 2 QTLs involucrados en la tolerancia al frío,

uno en el cromosoma 5 y otro en el 18. Algunos de los genes pertenecientes a esa región fueron identificados como posibles candidatos para la tolerancia al frío en fruto de calabacín. Por ello, los marcadores KASP diseñados para cada región pueden ser utilizados en futuros programas de mejora genética.



## **6. BIBLIOGRAFÍA**



- Abreu, A.C., Aguilera-Sáez, L.M., Peña, A., García-Valverde, M., Marín, P., Valera, D.L., Fernández, I., 2018. NMR-Based metabolomics approach to study the influence of different conditions of water irrigation and greenhouse ventilation on zucchini crops. *J. Agric. Food Chem.* 66, 8422–8432. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02590>
- Adhikary, T., Gill, P.P.S., Jawandha, S.K., Sinha, A., 2022. Chitosan coating modulates cell wall degrading enzymes and preserved postharvest quality in cold-stored pear fruit. *J. Food Meas. Charact.* 16, 1395–1403. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01291-8>
- Afonso, S., Oliveira, I., Ribeiro, C., Vilela, A., Meyer, A.S., Gonçalves, B., 2023. Innovative edible coatings for postharvest storage of sweet cherries. *Sci. Hortic.* 310, 111738. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111738>
- Aghdam, M.S., Asghari, M., Farmani, B., Mohayeji, M., Moradbeygi, H., 2012. Impact of postharvest brassinosteroids treatment on PAL activity in tomato fruit in response to chilling stress. *Sci. Hortic.* 144, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.07.008>
- Aghdam, M.S., Moradi, M., Razavi, F., Rabiei, V., 2019. Exogenous phenylalanine application promotes chilling tolerance in tomato fruits during cold storage by ensuring supply of NADPH for activation of ROS scavenging systems. *Sci. Hortic.* 246, 818–825. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.074>
- Aguado, E., García, A., Iglesias-Moya, J., Romero, J., Wehner, T.C., Gómez-Guillamón, M.L., Picó, B., Garcés-Claver, A., Martínez, C., Jamilena, M., 2020. Mapping a partial andromonoecy locus in *Citrullus lanatus* using BSA-Seq and GWAS approaches. *Front. Plant Sci.* 11.
- Aider, M., 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 837–842. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.021>
- Al-Babili, S., Bouwmeester, H.J., 2015. Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 161–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114759>
- Albergaria, E.T., Oliveira, A.F.M., Albuquerque, U.P., 2020. The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. *South Afr. J. Bot.* 131, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.002>
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.* 24, 1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Ali, A., Muhammad, M.T.M., Sijam, K., Siddiqui, Y., 2011. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chem.* 124, 620–626. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.085>
- Ali, S., Anjum, M.A., Ejaz, S., Hussain, S., Ercisli, S., Saleem, M.S., Sardar, H., 2021. Carboxymethyl cellulose coating delays chilling injury

- development and maintains eating quality of 'Kinnow' mandarin fruits during low temperature storage. *Int. J. Biol. Macromol.* 168, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.028>
- Ali, S., Nawaz, A., Naz, S., Ejaz, S., Maqbool, M., Siddiqui, M.H., Kalaji, H.M., Wróbel, J., Telesiński, A., Auriga, A., 2022. Hydrogen sulfide mitigates chilling injury of postharvest banana fruits by regulating  $\gamma$ -aminobutyric acid shunt pathway and ascorbate–glutathione cycle. *Front. Plant Sci.* 13, 941246. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.941246>
- Allwood, E.G., Davies, D.R., Gerrish, C., Ellis, B.E., Bolwell, G.P., 1999. Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Lett.* 457, 47–52. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00998-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00998-9)
- Alós, E., Rodrigo, M.J., Zacarias, L., 2013. Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 207, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.02.007>
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331–1341. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331>
- Amariz, A., Lima, M.A.C. de, Trindade, D.C.G. da, Santos, A.C.N. dos, Ribeiro, T.P., 2010. Coatings based on carboximethyl cellulose and dextrin in “Tommy Atkins” mango fruit stored under refrigeration. *Ciênc. Rural* 40, 2199–2205. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010001000024>
- Andersson, L., Rydberg, U., Larsson, H., Andersson, R., Åman, P., 2002. Preparation and characterisation of linear dextrans and their use as substrates in in vitro studies of starch branching enzymes. *Carbohydr. Polym.* 47, 53–58. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00162-X)
- Aparato, V.P.M., Suh, D.-Y., 2022. The functions and applications of GDSE esterase/lipase proteins in agriculture: A review. *JSFA Rep.* 2, 304–312. <https://doi.org/10.1002/jsf2.70>
- Apel, K., Hirt, H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signaling Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–99.
- Arbona, V., Hossain, Z., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A., 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiol. Plant.* 132, 452–466. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01029.x>
- Arnon, H., Granit, R., Porat, R., Poverenov, E., 2015. Development of polysaccharides-based edible coatings for citrus fruits: A layer-by-layer approach. *Food Chem.* 166, 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.061>
- Avashthi, H., Pathak, R.K., Pandey, N., Arora, S., Mishra, A.K., Gupta, V.K., Ramteke, P.W., Kumar, A., 2018. Transcriptome-wide identification of genes involved in Ascorbate–Glutathione cycle (Halliwell–Asada pathway) and related pathway for elucidating its role in antioxidative

- potential in finger millet (*Eleusine coracana* (L.)). 3 Biotech 8, 499. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1511-9>
- Balandrán-Quintana, R.R., Mendoza-Wilson, A.M., Gardea-Béjar, A.A., Vargas-Arispuro, I., Angel Martínez-Téllez, M., 2003. Irreversibility of chilling injury in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.) could be a programmed event long before the visible symptoms are evident. Biochem. Biophys. Res. Commun. 307, 553–557. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01212-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01212-9)
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 99, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Baker, R.A., 1995. Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. HortScience 30, 35–38.
- Bang, J., Lim, S., Yi, G., Lee, J.G., Lee, E.J., 2019. Integrated transcriptomic-metabolomic analysis reveals cellular responses of harvested strawberry fruit subjected to short-term exposure to high levels of carbon dioxide. Postharvest Biol. Technol. 148, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.003>
- Baraiya, N.S., Rao, T.V.R., Thakkar, V.R., 2016. Composite coating as a carrier of antioxidants improves the postharvest shelf life and quality of table grapes (*Vitis vinifera* L. var. Thompson Seedless). J. Agric. Sci. Technol. 18, 93–107.
- Barickman, T.C., Kopsell, D.A., Sams, C.E., 2014. Absciscic acid increases carotenoid and chlorophyll concentrations in leaves and fruit of two tomato genotypes. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 139, 261–266. <https://doi.org/10.21273/JASHS.139.3.261>
- Barman, K., Asrey, R., Pal, R.K., 2011. Putrescine and carnauba wax pretreatments alleviate chilling injury, enhance shelf life and preserve pomegranate fruit quality during cold storage. Sci. Hortic. 130, 795–800. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.005>
- Barros, J., Serrani-Yarce, J.C., Chen, F., Baxter, D., Venables, B.J., Dixon, R.A., 2016. Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis. Nat. Plants 2, 1–9. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.50>
- Benítez, Á., Iglesias-Moya, J., Segura, M., Carvajal, F., Palma, F., Garrido, D., Martínez, C., Jamilena, M., 2022. RNA-seq based analysis of transcriptomic changes associated with ABA-induced postharvest cold tolerance in zucchini fruit. Postharvest Biol. Technol. 192, 112023. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112023>
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. Anal. Biochem. 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berbel, J., Posadillo, A., 2018. Review and analysis of alternatives for the valorisation of agro-industrial olive oil by-products. Sustainability 10, 237. <https://doi.org/10.3390/su10010237>

- Beyer, W.F., Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161, 559–566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Ann. Bot.* 91, 179–194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcfl18>
- Brizzolara, S., Hertog, M., Tosetti, R., Nicolai, B., Tonutti, P., 2018. Metabolic responses to low temperature of three peach fruit cultivars differently sensitive to cold storage. *Front. Plant Sci.* 9.
- Brown, J.M., Yu, X., Holloway, H.M.P., Tuong, T.D., Schwartz, B.M., Patton, A.J., Arellano, C., Livingston, D.P., Milla-Lewis, S.R., 2021. Identification of QTL associated with cold acclimation and freezing tolerance in *Zoysia japonica*. *Crop Sci.* 61, 3044–3055. <https://doi.org/10.1002/csc2.20368>
- Brummell, D.A., Harpster, M.H., 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants, in: Carpita, N.C., Campbell, M., Tierney, M. (Eds.), *Plant Cell Walls*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 311–340. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0668-2\\_18](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0668-2_18)
- Bu, J., Yu, Y., Aisikaer, G., Ying, T., 2013. Postharvest UV-C irradiation inhibits the production of ethylene and the activity of cell wall-degrading enzymes during softening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 86, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.07.026>
- Buran, T.J., Sandhu, A.K., Azeredo, A.M., Bent, A.H., Williamson, J.G., Gu, L., 2012. Effects of exogenous abscisic acid on fruit quality, antioxidant capacities, and phytochemical contents of southern high bush blueberries. *Food Chem.* 132, 1375–1381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.124>
- Cao, S.F., Hu, Z.C., Wang, H.O., 2009. Effect of salicylic acid on the activities of anti-oxidant enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in cucumber fruit in relation to chilling injury. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 84, 125–130. <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512492>
- Carmona, L., Sulli, M., Diretto, G., Alquezar, B., Alves, M., Pena, L., 2022. Improvement of antioxidant properties in fruit from two blood and blond orange cultivars by postharvest storage at low temperature. *Antioxidants* 11, 547. <https://doi.org/10.3390/antiox11030547>
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- Carvajal, F., Castro-Cegri, A., Jiménez-Muñoz, R., Jamilena, M., Garrido, D., Palma, F., 2021. Changes in morphology, metabolism and composition of cuticular wax in zucchini fruit during postharvest cold storage. *Front. Plant Sci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.778745>

- Carvajal, F., Martínez, C., Jamilena, M., Garrido, D., 2011. Differential response of zucchini varieties to low storage temperature. *Sci. Hortic.* 130, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.016>
- Carvajal, F., Palma, F., Jamilena, M., Garrido, D., 2015a. Preconditioning treatment induces chilling tolerance in zucchini fruit improving different physiological mechanisms against cold injury. *Ann. Appl. Biol.* 166, 340–354. <https://doi.org/10.1111/aab.12189>
- Carvajal, Fátima, Palma, F., Jamilena, M., Garrido, D., 2015b. Cell wall metabolism and chilling injury during postharvest cold storage in zucchini fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 108, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.013>
- Carvajal, F., Palma, F., Jiménez-Muñoz, R., Jamilena, M., Pulido, A., Garrido, D., 2017. Unravelling the role of abscisic acid in chilling tolerance of zucchini during postharvest cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 133, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.07.004>
- Castro-Cegri, A., Carvajal, F., Osorio, S., Jamilena, M., Garrido, D., Palma, F., 2023a. Postharvest abscisic acid treatment modulates the primary metabolism and the biosynthesis of t-zeatin and riboflavin in zucchini fruit exposed to chilling stress. *Postharvest Biol. Technol.* 204, 112457. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112457>
- Castro-Cegri, A., Ortega-Muñoz, M., Sierra, S., Carvajal, F., Santoyo-Gonzalez, F., Garrido, D., Palma, F., 2023b. Application of polysaccharide-based edible coatings to improve the quality of zucchini fruit during postharvest cold storage. *Sci. Hortic.* 314, 111941. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.111941>
- Castro-Cegri, A., Sierra, S., Hidalgo-Santiago, L., Esteban-Muñoz, A., Jamilena, M., Garrido, D., Palma, F., 2023c. Postharvest treatment with abscisic acid alleviates chilling injury in zucchini fruit by regulating phenolic metabolism and non-enzymatic Antioxidant System. *Antioxidants* 12, 211. <https://doi.org/10.3390/antiox12010211>
- Cebrián, G., Segura, M., Martínez, J., Iglesias-Moya, J., Martínez, C., Garrido, D., Jamilena, M., 2023. Jasmonate-deficient mutant *lox3a* reveals crosstalk between jasmonate and ethylene in the differential regulation of male and female flower opening and early fruit development in *Cucurbita pepo*. *J. Exp. Bot.* 74, 1258–1274. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac468>
- Cenobio-Galindo, A. de J., Ocampo-López, J., Reyes-Munguía, A., Carrillo-Inungaray, M.L., Cawood, M., Medina-Pérez, G., Fernández-Luqueño, F., Campos-Montiel, R.G., 2019. Influence of bioactive compounds incorporated in a nanoemulsion as coating on avocado fruits (*Persea americana*) during postharvest storage: antioxidant activity, physicochemical changes and structural evaluation. *Antioxidants* 8, 500. <https://doi.org/10.3390/antiox8100500>
- Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2012. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide

- films – A comparative study. *Food Hydrocoll.* 27, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.07.007>
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *J. Food Drug Anal.* 10, 178–182.
- Chen, D., He, L., Lin, M., Jing, Y., Liang, C., Liu, H., Gao, J., Zhang, W., Wang, M., 2021. A ras-related small GTP-binding protein, RabE1c, regulates stomatal movements and drought stress responses by mediating the interaction with ABA receptors. *Plant Sci.* 306, 110858. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110858>
- Chen, L.-L., Shan, W., Cai, D.-L., Chen, J.-Y., Lu, W.-J., Su, X.-G., Kuang, J.-F., 2021. Postharvest application of glycine betaine ameliorates chilling injury in cold-stored banana fruit by enhancing antioxidant system. *Sci. Hortic.* 287, 110264. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110264>
- Chen, Y., Awasthi, A.K., Wei, F., Tan, Q., Li, J., 2021. Single-use plastics: Production, usage, disposal, and adverse impacts. *Sci. Total Environ.* 752, 141772. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141772>
- Cheng, X., Wang, X., Zhang, A., Wang, P., Chen, Q., Ma, T., Li, W., Liang, Y., Sun, X., Fang, Y., 2020. Foliar phenylalanine application promoted antioxidant activities in cabernet sauvignon by regulating phenolic biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 68, 15390–15402. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05565>
- Cheyrier, V., 2012. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochem. Rev.* 11, 153–177. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>
- Cingolani, P., 2022. Variant annotation and functional prediction: SnpEff, in: Ng, C., Pisuoglio, S. (Eds.), *Variant Calling: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer US, New York, NY, pp. 289–314. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2293-3\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2293-3_19)
- Civello, P.M., Martínez, G.A., Chaves, A.R., Añón, M.C., 1997. Heat treatments delay ripening and postharvest decay of Strawberry Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4589–4594. <https://doi.org/10.1021/jf9700337>
- Dai, D., Tong, H., Cheng, L., Peng, F., Zhang, T., Qi, W., Song, R., 2019. Maize Dek33 encodes a pyrimidine reductase in riboflavin biosynthesis that is essential for oil-body formation and ABA biosynthesis during seed development. *J. Exp. Bot.* 70, 5173–5187. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz268>
- Davik, J., Koehler, G., From, B., Torp, T., Rohloff, J., Eidem, P., Wilson, R.C., Sønsteby, A., Randall, S.K., Alsheikh, M., 2013. Dehydrin, alcohol dehydrogenase, and central metabolite levels are associated with cold tolerance in diploid strawberry (*Fragaria* spp.). *Planta* 237, 265–277. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1771-2>
- Debeaufort, F., Voilley, A., 2009. Lipid-based edible films and coatings, in: Huber, K.C., Embuscado, M.E. (Eds.), *edible films and coatings for food applications*. Springer, New York, NY, pp. 135–168. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_5)

- Deng, B., Jin, X., Yang, Y., Lin, Z., Zhang, Y., 2014. The regulatory role of riboflavin in the drought tolerance of tobacco plants depends on ROS production. *Plant Growth Regul.* 72, 269–277. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9858-8>
- Dhami, K.S., Asrey, R., Vinod, B.R., Meena, N.K., 2023. Postharvest methyl jasmonate alleviates chilling injury and maintains quality of ‘Kinnow’ (*Citrus Nobilis* Lour x *C. deliciosa* Tenora) fruits under differential storage temperature. *Erwerbs-Obstbau* <https://doi.org/10.1007/s10341-023-00880-1>
- Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M., Valero, D., 2009. Changes in hydrophilic and lipophilic antioxidant activity and related bioactive compounds during postharvest storage of yellow and purple plum cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 51, 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.09.007>
- Diretto, G., Frusciante, S., Fabbri, C., Schauer, N., Busta, L., Wang, Z., Matas, A.J., Fiore, A., K.C. Rose, J., Fernie, A.R., Jetter, R., Mattei, B., Giovannoni, J., Giuliano, G., 2020. Manipulation of  $\beta$ -carotene levels in tomato fruits results in increased ABA content and extended shelf life. *Plant Biotechnol. J.* 18, 1185–1199. <https://doi.org/10.1111/pbi.13283>
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., Heredia, A., 2011. The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol.* 189, 938–949. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03553.x>
- Dovale-Rosabal, G., Casariego, A., Forbes-Hernandez, T.Y., García, M.A., 2015. Effect of chitosan-olive oil emulsion coating on quality of tomatoes during storage at ambient conditions. *J. Berry Res.* 5, 207–218. <https://doi.org/10.3233/JBR-150103>
- Duong, N.T.C., Uthairatanakij, A., Laohakunjit, N., Jitareerat, P., Kaisangsri, N., 2022. An innovative single step of cross-linked alginate-based edible coating for maintaining postharvest quality and reducing chilling injury in rose apple cv. “Tabtimchan” (*Syzygium samarangense*). *Sci. Hortic.* 292, 110648. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110648>
- El-hilali, F., Ait-Oubahou, A., Remah, A., Akhayat, O., 2003. Chilling injury and peroxidase activity changes in “Fortune” mandarin fruit during low temperature storage. *Bulg. J. Plant Physiol.* 29.
- Esteban-Muñoz, A., Sánchez-Hernández, S., Samaniego-Sánchez, C., Giménez-Martínez, R., Olalla-Herrera, M., 2021. Differences in the phenolic profile by UPLC coupled to high resolution mass spectrometry and antioxidant capacity of two *Diospyros kaki* Varieties. *Antioxidants* 10, 31. <https://doi.org/10.3390/antiox10010031>
- Esteras, C., Nuez, F., Picó, B., 2011. Genetic diversity studies in Cucurbits using molecular tools. *Genetics, Genomics and Breeding of Cucurbits*, 140–198.
- Esteras, C., Gómez, P., Monforte, A.J., Blanca, J., Vicente-Dólera, N., Roig, C., Nuez, F., Picó, B., 2012. High-throughput SNP genotyping in

- Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait loci mapping. BMC Genomics 13, 80. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-80>
- Etemadipoor, R., Dastjerdi, A.M., Ramezani, A., Ehteshami, S., 2020. Ameliorative effect of gum arabic, oleic acid and/or cinnamon essential oil on chilling injury and quality loss of guava fruit. Sci. Hortic. 266, 109255. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109255>
- F. Abdelgawad, K., M. El-Mogy, M., I. A. Mohamed, M., Garchery, C., G. Stevens, R., 2019. Increasing ascorbic acid content and salinity tolerance of cherry tomato plants by suppressed expression of the ascorbate oxidase gene. Agronomy 9, 51. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020051>
- FAOSTAT: Departamento de estadística de la FAO, 2023 <https://www.fao.org/faostat/es/>
- Fan, S., Li, Q., Feng, S., Lei, Q., Abbas, F., Yao, Y., Chen, W., Li, X., Zhu, X., 2022. Melatonin maintains fruit quality and reduces anthracnose in postharvest papaya via enhancement of antioxidants and inhibition of pathogen development. Antioxidants 11, 804. <https://doi.org/10.3390/antiox11050804>
- Fan, X., Jiang, W., Gong, H., Yang, Y., Zhang, A., Liu, H., Cao, J., Guo, F., Cui, K., 2019. Cell wall polysaccharides degradation and ultrastructure modification of apricot during storage at a near freezing temperature. Food Chem. 300, 125194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125194>
- FEPEX, 2023: Federación española de productores y exportadores de frutos, vegetales, flores y plantas vivas, <https://www.fepex.es/home.aspx>
- Ferriol, M., Pico, B., Nuez, F., 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 107, 271-282.
- Finkelstein, R., 2013. Absciscic acid synthesis and response. Arab. Book Am. Soc. Plant Biol. 11. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Fischer, M., Bacher, A., 2006. Biosynthesis of vitamin B2 in plants. Physiol. Plant. 126, 304-318. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00607.x>
- Flores, G., Blanch, G.P., del Castillo, M.L.R., 2017. Effect of postharvest methyl jasmonate treatment on fatty acid composition and phenolic acid content in olive fruits during storage. J. Sci. Food Agric. 97, 2767-2772. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8104>
- Flores, G., Ruiz del Castillo, M.L., 2014. Influence of preharvest and postharvest methyl jasmonate treatments on flavonoid content and metabolomic enzymes in red raspberry. Postharvest Biol. Technol. 97, 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.06.009>
- Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133, 21-25. <https://doi.org/10.1007/BF00386001>

- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866–1875. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>
- Francisco, C.B., Pellá, M.G., Silva, O.A., Raimundo, K.F., Caetano, J., Linde, G.A., Colauto, N.B., Dragunski, D.C., 2020. Shelf-life of guavas coated with biodegradable starch and cellulose-based films. *Int. J. Biol. Macromol.* 152, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.249>
- García, A., Aguado, E., Garrido, D., Martínez, C., Jamilena, M., 2020a. Two androecious mutations reveal the crucial role of ethylene receptors in the initiation of female flower development in *Cucurbita pepo*. *Plant J.* 103, 1548–1560. <https://doi.org/10.1111/tpj.14846>
- García, A., Aguado, E., Martínez, C., Loska, D., Beltrán, S., Valenzuela, J.L., Garrido, D., Jamilena, M., 2020b. The ethylene receptors CpETR1A and CpETR2B cooperate in the control of sex determination in *Cucurbita pepo*. *J. Exp. Bot.* 71, 154–167. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz417>
- García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E., 1998. Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria × Ananassa*) quality and stability. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3758–3767. <https://doi.org/10.1021/jf980014c>
- García-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V.M., Hénaff, E., Câmara, F., Cozzuto, L., Lowy, E., Alioto, T., Capella-Gutiérrez, S., Blanca, J., Cañizares, J., Ziaresolo, P., Gonzalez-Ibeas, D., Rodríguez-Moreno, L., Droege, M., Du, L., Alvarez-Tejado, M., Lorente-Galdos, B., Melé, M., Yang, L., Weng, Y., Navarro, A., Marques-Bonet, T., Aranda, M.A., Nuez, F., Picó, B., Gabaldón, T., Roma, G., Guigó, R., Casacuberta, J.M., Arús, P., Puigdomènech, P., 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 11872–11877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205415109>
- Gil, M.I., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., 1999. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (Flavonoids and Vitamin C) of fresh-cut spinach. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2213–2217. <https://doi.org/10.1021/jf9812001>
- Gill, S.S., Anjum, N.A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Mishra, P., Sabat, S.C., Tuteja, N., 2015. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 10375–10394. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4532-5>
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Guajardo, E., Correa, J.A., Contreras-Porcia, L., 2016. Role of abscisic acid (ABA) in activating antioxidant tolerance responses to desiccation stress in intertidal seaweed species. *Planta* 243, 767–781. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2438-6>

- Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Faleiro, M.L., Miguel, M.G.C., Antunes, M.D.C., 2015. The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. *Postharvest Biol. Technol.* 100, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.002>
- Guo, S., Zhang, J., Sun, H., Salse, J., Lucas, W.J., Zhang, H., Zheng, Y., Mao, L., Ren, Y., Wang, Z., Min, J., Guo, X., Murat, F., Ham, B.-K., Zhang, Zhaoliang, Gao, S., Huang, M., Xu, Yimin, Zhong, S., Bombarely, A., Mueller, L.A., Zhao, H., He, H., Zhang, Y., Zhang, Zhonghua, Huang, S., Tan, T., Pang, E., Lin, K., Hu, Q., Kuang, H., Ni, P., Wang, B., Liu, J., Kou, Q., Hou, W., Zou, X., Jiang, J., Gong, G., Klee, K., Schoof, H., Huang, Y., Hu, X., Dong, S., Liang, D., Wang, Juan, Wu, K., Xia, Y., Zhao, X., Zheng, Z., Xing, M., Liang, X., Huang, B., Lv, T., Wang, Junyi, Yin, Y., Yi, H., Li, R., Wu, M., Levi, A., Zhang, X., Giovannoni, J.J., Wang, Jun, Li, Y., Fei, Z., Xu, Yong, 2013. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nat. Genet.* 45, 51–58. <https://doi.org/10.1038/ng.2470>
- Gurjar, P., Killadi, B., Lenka, J., Shukla, D., 2018. Effect of gum arabic coatings on physico-chemical and sensory qualities of guava (*Psidium guajava* L) cv. Shweta. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.424>
- Gutiérrez, C., Figueroa, C.R., Turner, A., Munné-Bosch, S., Muñoz, P., Schreiber, L., Zeisler, V., Marín, J.C., Balbontín, C., 2021. Absciscic acid applied to sweet cherry at fruit set increases amounts of cell wall and cuticular wax components at the ripe stage. *Sci. Hortic.* 283, 110097. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110097>
- Gutiérrez, T.J., Morales, N.J., Pérez, E., Tapia, M.S., Famá, L., 2015. Physico-chemical properties of edible films derived from native and phosphated cush-cush yam and cassava starches. *Food Packag. Shelf Life* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.09.002>
- Habibi, F., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., 2022. Postharvest treatment with glycine betaine enhances chilling tolerance of blood orange fruit by increasing antioxidant defence systems and osmoregulation during cold storage. *Sci. Hortic.* 305, 111352. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111352>
- Habibi, F., Ramezani, A., Rahemi, M., Eshghi, S., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., 2019. Postharvest treatments with  $\gamma$ -aminobutyric acid, methyl jasmonate, or methyl salicylate enhance chilling tolerance of blood orange fruit at prolonged cold storage. *J. Sci. Food Agric.* 99, 6408–6417. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9920>
- Halliwell, B., Foyer, C.H., 1976. Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. *Biochem. J.* 155, 697–700. <https://doi.org/10.1042/bj1550697>
- Han, Y., Zhu, Q., Zhang, Z., Meng, K., Hou, Y., Ban, Q., Suo, J., Rao, J., 2015. Analysis of xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) genes and diverse roles of isoenzymes during persimmon fruit development

- and postharvest softening. PLOS ONE 10, e0123668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123668>
- Hanaei, S., Bodaghi, H., Ghasimi Hagh, Z., 2022. Alleviation of postharvest chilling injury in sweet pepper using salicylic acid foliar spraying incorporated with caraway oil coating under cold storage. Front. Plant Sci. 13.
- Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Lotan-Pompan, M., Lev, S., Cohen, S., Dai, N., Yeselson, L., Meir, A., Libhaber, S.E., Avisar, E., Melame, T., van Koert, P., Verbakel, H., Hofstede, R., Volpin, H., Oliver, M., Fougere, A., Stalh, C., Fauve, J., Copes, B., Fei, Z., Giovannoni, J., Ori, N., Lewinsohn, E., Sherman, A., Burger, J., Tadmor, Y., Schaffer, A.A., Katzir, N., 2010. A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. Theor. Appl. Genet. 121, 511–533. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1327-4>
- Hassan, B., Chatha, S.A.S., Hussain, A.I., Zia, K.M., Akhtar, N., 2018. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. Int. J. Biol. Macromol. 109, 1095–1107. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>
- He, M., Wu, Y., Hong, M., Yun, Z., Li, T., Jiang, Y., 2021.  $\alpha$ -Lipoic acid treatment alleviates postharvest pericarp browning of litchi fruit by regulating antioxidant ability and energy metabolism. Postharvest Biol. Technol. 180, 111629. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111629>
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hernandez, C.O., Labate, J., Reitsma, K., Fabrizio, J., Bao, K., Fei, Z., Grumet, R., Mazourek, M., 2023. Characterization of the USDA *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, and *C. maxima* germplasm collections. Front. Plant Sci. 14.
- Hossain, M.A., Asada, K., 1984. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: Its protection by ascorbate. Plant Cell Physiol. 25, 1285–1295. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076837>
- Hou, Y., Liu, L., Liu, Y., Zhao, L., Bao, Y., Zheng, Y., Jin, P., 2023. N- $\alpha$ -lauroyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride combined with hot water treatment alleviates chilling injury of postharvest cucumber fruit. Sci. Hortic. 315, 111986. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.111986>
- Hu, S., Hou, Y., Zhao, L., Zheng, Y., Jin, P., 2023. Exogenous 24-epibrassinolide alleviates chilling injury in peach fruit through modulating PpGATA12-mediated sucrose and energy metabolisms. Food Chem. 400, 133996. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133996>

- Hu, W., Sarengaowa, Feng, K., 2022. Effect of edible coating on the quality and antioxidant enzymatic activity of postharvest sweet cherry (*Prunusavium* L.) during Storage. *Coatings* 12, 581. <https://doi.org/10.3390/coatings12050581>
- Hu, Y., Wu, Q., Sprague, S.A., Park, J., Oh, M., Rajashekar, C.B., Koiwa, H., Nakata, P.A., Cheng, N., Hirschi, K.D., White, F.F., Park, S., 2015. Tomato expressing Arabidopsis glutaredoxin gene AtGRXS17 confers tolerance to chilling stress via modulating cold responsive components. *Hortic. Res.* 2, 15051. <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.51>
- Hu, Z., Shi, X., Chen, X., Zheng, J., Zhang, A., Wang, H., Fu, Q., 2022. Fine-mapping and identification of a candidate gene controlling seed coat color in melon (*Cucumis melo* L. var. chinensis Pangalo). *Theor. Appl. Genet.* 135, 803–815. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03999-5>
- Huang, H.-X., Yu, T., Li, J.-X., Qu, S.-P., Wang, M.-M., Wu, T.-Q., Zhong, Y.-J., 2019. Characterization of *Cucurbita maxima* fruit metabolomic profiling and transcriptome to reveal fruit quality and ripening gene expression patterns. *J. Plant Biol.* 62, 203–216. <https://doi.org/10.1007/s12374-019-0015-4>
- Huang, S., Li, R., Zhang, Z., Li, L., Gu, X., Fan, W., Lucas, W.J., Wang, X., Xie, B., Ni, P., Ren, Yuanyuan, Zhu, H., Li, Jun, Lin, K., Jin, W., Fei, Z., Li, Guangcun, Staub, J., Kilian, A., van der Vossen, E.A.G., Wu, Y., Guo, J., He, J., Jia, Z., Ren, Yi, Tian, G., Lu, Y., Ruan, J., Qian, W., Wang, M., Huang, Q., Li, B., Xuan, Z., Cao, J., Asan, Wu, Z., Zhang, J., Cai, Q., Bai, Y., Zhao, B., Han, Y., Li, Ying, Li, X., Wang, S., Shi, Q., Liu, Shiqiang, Cho, W.K., Kim, J.-Y., Xu, Y., Heller-Uszynska, K., Miao, H., Cheng, Z., Zhang, S., Wu, J., Yang, Y., Kang, H., Li, M., Liang, H., Ren, X., Shi, Z., Wen, M., Jian, M., Yang, Hailong, Zhang, G., Yang, Z., Chen, R., Liu, Shifang, Li, Jianwen, Ma, L., Liu, H., Zhou, Y., Zhao, J., Fang, X., Li, Guoqing, Fang, L., Li, Yingrui, Liu, D., Zheng, Hongkun, Zhang, Y., Qin, N., Li, Z., Yang, G., Yang, S., Bolund, L., Kristiansen, K., Zheng, Hancheng, Li, Shaochuan, Zhang, X., Yang, Huanming, Wang, Jian, Sun, R., Zhang, B., Jiang, S., Wang, Jun, Du, Y., Li, Songgang, 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat. Genet.* 41, 1275–1281. <https://doi.org/10.1038/ng.475>
- Hussain, P.R., Meena, R.S., Dar, M.A., Wani, A.M., 2010. Carboxymethyl cellulose coating and low-dose gamma irradiation improves storage quality and shelf life of pear (*Pyrus communis* L., Cv. Bartlett/William). *J. Food Sci.* 75, M586-596. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01868.x>
- Hussain, Q., Asim, M., Zhang, R., Khan, R., Farooq, S., Wu, J., 2021. Transcription factors interact with ABA through gene expression and signaling pathways to mitigate drought and salinity stress. *biomolecules* 11, 1159. <https://doi.org/10.3390/biom11081159>
- Hyun, J.-E., Moon, S.-K., Lee, S.-Y., 2022. Application of blue light-emitting diode in combination with antimicrobials or photosensitizers to

- inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut apples and cherry tomatoes. *Food Control* 131, 108453. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108453>
- Iqbal, N., Sehar, Z., Fatma, M., Umar, S., Sofo, A., Khan, N.A., 2022. Nitric oxide and abscisic acid mediate heat stress tolerance through regulation of osmolytes and antioxidants to protect photosynthesis and growth in wheat plants. *Antioxidants* 11, 372. <https://doi.org/10.3390/antiox11020372>
- Islamipour, Z., Zare, E.N., Salimi, F., Ghomi, M., Makvandi, P., 2022. Biodegradable antibacterial and antioxidant nanocomposite films based on dextrin for bioactive food packaging. *J. Nanostructure Chem.* 12, 991–1006. <https://doi.org/10.1007/s40097-022-00491-4>
- Jafarzadeh, S., Mohammadi Nafchi, A., Salehabadi, A., Oladzaad-abbasabadi, N., Jafari, S.M., 2021. Application of bio-nanocomposite films and edible coatings for extending the shelf life of fresh fruits and vegetables. *Adv. Colloid Interface Sci.* 291, 102405. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102405>
- Jannatizadeh, A., 2019. Exogenous melatonin applying confers chilling tolerance in pomegranate fruit during cold storage. *Sci. Hortic.* 246, 544–549. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.027>
- Jeffrey, C., 2005. A new system of Cucurbitaceae. *Botanicheskii Zhurnal* (St. Petersburg) 90, 332–335.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., Sayadi, S., 2008. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem. Biol. Interact.* 176, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.08.014>
- Jiang, J., Hou, R., Yang, N., Li, L., Deng, J., Qin, G., Ding, D., 2021. Physiological and TMT-labeled proteomic analyses reveal important roles of sugar and secondary metabolism in *Citrus junos* under cold stress. *J. Proteomics* 237, 104145. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104145>
- Jiang, L., Tian, X., Li, S., Fu, Y., Xu, J., Wang, G., 2019. The AabHLH35 transcription factor identified from *Anthurium andraeanum* is involved in cold and drought tolerance. *Plants* 8, 216. <https://doi.org/10.3390/plants8070216>
- Jiang, T., Feng, L., Zheng, X., 2012. Effect of chitosan coating enriched with thyme oil on postharvest quality and shelf life of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J. Agric. Food Chem.* 60, 188–196. <https://doi.org/10.1021/jf202638u>
- Jideani, A.I.O., Silungwe, H., Takalani, T., Omolola, A.O., Udeh, H.O., Anyasi, T.A., 2021. Antioxidant-rich natural fruit and vegetable products and human health. *Int. J. Food Prop.* 24, 41–67. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1866597>
- Jiménez-Muñoz, R., Palma, F., Carvajal, F., Castro-Cegri, A., Pulido, A., Jamilena, M., Romero-Puertas, M.C., Garrido, D., 2021. Pre-storage nitric oxide treatment enhances chilling tolerance of zucchini fruit

- (*Cucurbita pepo* L.) by S-nitrosylation of proteins and modulation of the antioxidant response. *Postharvest Biol. Technol.* 171, 111345. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111345>
- Jones, D.H., 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: Regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry* 23, 1349–1359. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80465-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80465-3)
- Jha, S., Sharma, M., K. Pandey, G., 2016. Role of cyclic nucleotide gated channels in stress management in plants. *Curr. Genomics* 17, 315–329.
- Kader, A.A., 2003. A summary of Ca requirements and recommendations for fruits other than apples and pears. *Acta Hortic.* 737–740. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.600.112>
- Kang, L., Ji, C.Y., Kim, S.H., Ke, Q., Park, S.-C., Kim, H.S., Lee, H.-U., Lee, J.S., Park, W.S., Ahn, M.-J., Lee, H.-S., Deng, X., Kwak, S.-S., 2017. Suppression of the  $\beta$ -carotene hydroxylase gene increases  $\beta$ -carotene content and tolerance to abiotic stress in transgenic sweetpotato plants. *Plant Physiol. Biochem.* 117, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.05.017>
- Kaplan, F., Guy, C.L., 2005. RNA interference of Arabidopsis beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant J.* 44, 730–743. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02565.x>
- Ke, W., Shao, X., Gong, Y., Xu, F., Wang, H., 2014. Effects of postharvest hot air treatment on gene expression associated with ascorbic acid metabolism in peach fruit. *Plant Mol. Biol. Report.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0699-z>
- Khan, N., Bano, A., Rahman, M.A., Rathinasabapathi, B., Babar, M.A., 2019. UPLC-HRMS-based untargeted metabolic profiling reveals changes in chickpea (*Cicer arietinum*) metabolome following long-term drought stress. *Plant Cell Environ.* 42, 115–132. <https://doi.org/10.1111/pce.13195>
- Kim, M.J., Lee, M.Y., Shon, J.C., Kwon, Y.S., Liu, K.-H., Lee, C.H., Ku, K.-M., 2019. Untargeted and targeted metabolomics analyses of blackberries – Understanding postharvest red drupelet disorder. *Food Chem.* 300, 125169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125169>
- Kim, S.H., Ahn, Y.O., Ahn, M.-J., Lee, H.-S., Kwak, S.-S., 2012. Down-regulation of  $\beta$ -carotene hydroxylase increases  $\beta$ -carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweetpotato. *Phytochemistry* 74, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.11.003>
- Kingwascharapong, P., Arisa, K., Karnjanapratum, S., Tanaka, Fumina, Tanaka, Fumihiko, 2020. Effect of gelatin-based coating containing frog skin oil on the quality of persimmon and its characteristics. *Sci. Hortic.* 260, 108864. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108864>
- Kondo, S., Tomiyama, A., Seto, H., 2000. Changes of endogenous jasmonic acid and methyl jasmonate in apples and sweet cherries during fruit

- development. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 125, 282–287.  
<https://doi.org/10.21273/JASHS.125.3.282>
- Kong, X., Wei, B., Gao, Z., Zhou, Y., Shi, F., Zhou, X., Zhou, Q., Ji, S., 2018. Changes in membrane lipid composition and function accompanying chilling injury in bell peppers. Plant Cell Physiol. 59, 167–178.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcx171>
- Kong, X., Zhou, Q., Luo, F., Wei, B., Wang, Y., Sun, H., Zhao, Y., Ji, S., 2019. Transcriptome analysis of harvested bell peppers (*Capsicum annuum* L.) in response to cold stress. Plant Physiol. Biochem. 139, 314–324.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.033>
- Król, A., Amarowicz, R., Weidner, S., 2014. Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. Acta Physiol. Plant. 36, 1491–1499. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1526-8>
- Kumar, P., Sethi, S., Sharma, R.R., Srivastav, M., Varghese, E., 2017. Effect of chitosan coating on postharvest life and quality of plum during storage at low temperature. Sci. Hortic. 226, 104–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.037>
- Kumar Patel, M., Fanyuk, M., Feyngenberg, O., Maurer, D., Sela, N., Ovadia, R., Oren-Shamir, M., Alkan, N., 2023. Phenylalanine induces mango fruit resistance against chilling injuries during storage at suboptimal temperature. Food Chem. 405, 134909.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134909>
- Larsson, C., Møller, I.M., Widell, S., 1990. Introduction to the plant plasma membrane — Its molecular composition and organization, in: Larsson, Christer, Møller, Ian M. (Eds.), The plant plasma membrane: structure, function and molecular biology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–15. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74522-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74522-5_1)
- Lazan, H., Ali, Z.Mohd., Liang, K.S., Yee, K.L., 1989. Polygalacturonase activity and variation in ripening of papaya fruit with tissue depth and heat treatment. Physiol. Plant. 77, 93–98.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb05983.x>
- Le, M.Q., Pagter, M., Hinch, D.K., 2015. Global changes in gene expression, assayed by microarray hybridization and quantitative RT-PCR, during acclimation of three *Arabidopsis thaliana* accessions to sub-zero temperatures after cold acclimation. Plant Mol. Biol. 87, 1–15.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-014-0256-z>
- Li, D., Luo, Z., Mou, W., Wang, Y., Ying, T., Mao, L., 2014. ABA and UV-C effects on quality, antioxidant capacity and anthocyanin contents of strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.). Postharvest Biol. Technol. 90, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.12.006>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools.

- Bioinformatics 25, 2078–2079.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, X., Zhao, W., Sun, X., Huang, H., Kong, L., Niu, D., Sui, X., Zhang, Z., 2013. Molecular cloning and characterization of violaxanthin de-epoxidase (CsVDE) in cucumber. PLOS ONE 8, e64383.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064383>
- Li, Y., Yin, Y., Bi, Y., Wang, D., 2012. Effect of riboflavin on postharvest disease of Asia pear and the possible mechanisms involved. Phytoparasitica 40, 261–268. <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0216-y>
- Li, Z., Li, B., Li, M., Fu, X., Zhao, X., Min, D., Li, F., Li, X., Zhang, X., 2022. Hot air pretreatment alleviates browning of fresh-cut pitaya fruit by regulating phenylpropanoid pathway and ascorbate-glutathione cycle. Postharvest Biol. Technol. 190, 111954.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111954>
- Liang, S., Kuang, J., Ji, S., Chen, Q., Deng, W., Min, T., Shan, W., Chen, J., Lu, W., 2020. The membrane lipid metabolism in horticultural products suffering chilling injury. Food Qual. Saf. 4, 9–14.  
<https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa001>
- Lima, Á.M., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Santos, E.C.M., Teixeira, J.A., Moreira, R.A., Vicente, A.A., 2010. New edible coatings composed of galactomannans and collagen blends to improve the postharvest quality of fruits – Influence on fruits gas transfer rate. J. Food Eng. 97, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.09.021>
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., Shen, H.-M., 2008. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. Curr. Cancer Drug Targets 8, 634–646. <https://doi.org/10.2174/156800908786241050>
- Lin, Yifen, Lin, Yuzhao, Lin, Yixiong, Lin, M., Chen, Y., Wang, H., Lin, H., 2019. A novel chitosan alleviates pulp breakdown of harvested longan fruit by suppressing disassembly of cell wall polysaccharides. Carbohydr. Polym. 217, 126–134.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.053>
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R., 2006. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. Nat. Protoc. 1, 387–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>
- Liu, H., Huang, Z., Lyu, L., Fan, S., Wu, W., Li, W., 2021. Effect of ferulic acid and natamycin treatments on quality and reactive oxygen species metabolism of postharvest blackberry. J. Food Nutr. Res. 60, 236–243.
- Liu, J., Li, Q., Chen, J., Jiang, Y., 2020. Revealing further insights on chilling injury of postharvest bananas by untargeted lipidomics. Foods 9, 894.  
<https://doi.org/10.3390/foods9070894>
- Liu, L., Wei, Y., Shi, F., Liu, C., Liu, X., Ji, S., 2015. Intermittent warming improves postharvest quality of bell peppers and reduces chilling injury. Postharvest Biol. Technol. 101, 18–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.11.006>

- Liu, Q., Xin, D., Xi, L., Gu, T., Jia, Z., Zhang, B., Kou, L., 2022. Novel applications of exogenous melatonin on cold stress mitigation in postharvest cucumbers. *J. Agric. Food Res.* 10, 100459. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100459>
- Liu, X., Cui, X., Ji, D., Zhang, Z., Li, B., Xu, Y., Chen, T., Tian, S., 2021. Luteolin-induced activation of the phenylpropanoid metabolic pathway contributes to quality maintenance and disease resistance of sweet cherry. *Food Chem.* 342, 128309. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128309>
- Liu, X., Ji, D., Cui, X., Zhang, Z., Li, B., Xu, Y., Chen, T., Tian, S., 2020. p-Coumaric acid induces antioxidant capacity and defense responses of sweet cherry fruit to fungal pathogens. *Postharvest Biol. Technol.* 169, 111297. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111297>
- Liu, Y., Dong, B., Zhang, C., Yang, L., Wang, Y., Zhao, H., 2020. Effects of exogenous abscisic acid (ABA) on carotenoids and petal color in *Osmanthus fragrans* ‘Yanhonggui.’ *Plants* 9, 454. <https://doi.org/10.3390/plants9040454>
- Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A.L., Randall, Rose J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lu, H., Lu, L., Zeng, L., Fu, D., Xiang, H., Yu, T., Zheng, X., 2014. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodosporidium paludigenum* against *Penicillium expansum* in apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 92, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.01.009>
- Luhua, S., Hegie, A., Suzuki, N., Shulaev, E., Luo, X., Cenariu, D., Ma, V., Kao, S., Lim, J., Gunay, M.B., Oosumi, T., Lee, S.C., Harper, J., Cushman, J., Gollery, M., Girke, T., Bailey-Serres, J., Stevenson, R.A., Zhu, J.-K., Mittler, R., 2013. Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiol. Plant.* 148, 322–333.
- Lyzenga, W.J., Booth, J.K., Stone, S.L., 2012. The Arabidopsis RING-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 71, 23–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2012.04965.x>
- Mahmood, Q., Ahmad, R., Kwak, S.-S., Rashid, A., Anjum, N.A., 2010. Ascorbate and glutathione: protectors of plants in oxidative stress, in: Anjum, N.A., Chan, M.-T., Umar, S. (Eds.), *Ascorbate-Glutathione pathway and stress tolerance in plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 209–229. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9404-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9404-9_7)
- Mahmoudi, R., Razavi, F., Rabiei, V., Palou, L., Gohari, G., 2022. Postharvest chitosan-arginine nanoparticles application ameliorates chilling injury in plum fruit during cold storage by enhancing ROS scavenging system activity. *BMC Plant Biol.* 22, 555. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03952-8>

- Mannozi, C., Tylewicz, U., Chinnici, F., Siroli, L., Rocculi, P., Dalla Rosa, M., Romani, S., 2018. Effects of chitosan-based coatings enriched with procyanidin by-product on quality of fresh blueberries during storage. *Food Chem.* 251, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.015>
- Mansfeld, B.N., Grumet, R., 2018. QTLseqr: An R package for bulk segregant analysis with next-generation sequencing. *Plant Genome* 11, 180006. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.01.0006>
- Mao, L., Pang, H., Wang, G., Zhu, C., 2007. Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.009>
- Marín-Rodríguez, M.C., Orchard, J., Seymour, G.B., 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* 53, 2115–2119. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf089>
- Markhart, A.H., 1986. Chilling Injury: A Review of Possible Causes. *HortScience* 21, 1329–1333. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.21.6.1329>
- Martínez-Téllez, M.A., Ramos-Clamont, M.G., Gardea, A.A., Vargas-Arispuro, I., 2002. Effect of infiltrated polyamines on polygalacturonase activity and chilling injury responses in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 98–101. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00631-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00631-9)
- Mason, T.J., Bettenhausen, H.M., Chaparro, J.M., Uchanski, M.E., Prenni, J.E., 2021. Evaluation of ambient mass spectrometry tools for assessing inherent postharvest pepper quality. *Hortic. Res.* 8, 160. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00596-x>
- Mattila, P., Hellström, J., Törrönen, R., 2006. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7193–7199. <https://doi.org/10.1021/jf0615247>
- Mattus-Araya, E., Guajardo, J., Herrera, R., Moya-León, M.A., 2022. ABA speeds up the progress of color in developing *F. chiloensis* Fruit through the activation of PAL, CHS and ANS, key genes of the phenylpropanoid/flavonoid and anthocyanin pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 3854. <https://doi.org/10.3390/ijms23073854>
- Megías, Z., Manzano, S., Martínez, C., García, A., Aguado, E., Garrido, D., del Mar Reboloso, M., Valenzuela, J.L., Jamilena, M., 2016a. Postharvest cold tolerance in summer squash and its association with reduced cold-induced ethylene production. *Euphytica* 213, 9. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1805-0>
- Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., García, A., del Mar Reboloso-Fuentes, M., Valenzuela, J.L., Garrido, D., Jamilena, M., 2016b. Ethylene biosynthesis and signaling elements involved in chilling injury and other postharvest quality traits in the non-climacteric fruit of zucchini (*Cucurbita pepo*). *Postharvest Biol. Technol.* 113, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.001>

- Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., García, A., Rebolloso-Fuentes, M. del M., Garrido, D., Valenzuela, J.L., Jamilena, M., 2015. Individual shrink wrapping of zucchini fruit improves postharvest chilling tolerance associated with a reduction in ethylene production and oxidative stress metabolites. *PLOS ONE* 10, e0133058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133058>
- Mellidou, I., Koukounaras, A., Kostas, S., Patelou, E., Kanellis, A.K., 2021. Regulation of vitamin C accumulation for improved tomato fruit quality and alleviation of abiotic stress. *Genes* 12, 694. <https://doi.org/10.3390/genes12050694>
- Mendoza, L., Yañez, K., Vivanco, M., Melo, R., Cotoras, M., 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Ind. Crops Prod.* 43, 360–364. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.048>
- Menga, A., Palmieri, E.M., Cianciulli, A., Infantino, V., Mazzone, M., Scilimati, A., Palmieri, F., Castegna, A., Iacobazzi, V., 2017. SLC25A26 overexpression impairs cell function via mtDNA hypermethylation and rewiring of methyl metabolism. *FEBS J.* 284, 967–984. <https://doi.org/10.1111/febs.14028>
- Mhamdi, A., Noctor, G., Baker, A., 2012. Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Arch. Biochem. Biophys.*, Catalases and Hydrogen Peroxide Metabolism 525, 181–194. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.015>
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G., 2010. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 61, 4197–4220. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>
- Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (mapa.gob.es, 2023).
- Miret, J.A., Munné-Bosch, S., 2016. Absciscic acid and pyrabactin improve vitamin C contents in raspberries. *Food Chem.* 203, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.046>
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Mizuno, M., Kamei, M., Tsuchida, H., 1998. Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. *IUBMB Life* 44, 717–726. <https://doi.org/10.1080/15216549800201762>
- Molaei, S., Soleimani, A., Rabiei, V., Razavi, F., 2021. Impact of chitosan in combination with potassium sorbate treatment on chilling injury and quality attributes of pomegranate fruit during cold storage. *J. Food Biochem.* 45, e13633. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13633>
- Molla, S.M.H., Rastegar, S., Omran, V.G., Khademi, O., 2022. Ameliorative effect of melatonin against storage chilling injury in pomegranate husk

- and arils through promoting the antioxidant system. *Sci. Hortic.* 295, 110889. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110889>
- Montero-Pau, J., Blanca, J., Bombarely, A., Ziaresolo, P., Esteras, C., Martí-Gómez, C., Ferriol, M., Gómez, P., Jamilena, M., Mueller, L., Picó, B., Cañizares, J., 2018. De novo assembly of the zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the Cucurbita genus. *Plant Biotechnol. J.* 16, 1161–1171. <https://doi.org/10.1111/pbi.12860>
- Montero-Pau, J., Blanca, J., Esteras, C., Martínez-Pérez, E.Ma., Gómez, P., Monforte, A.J., Cañizares, J., Picó, B., 2017. An SNP-based saturated genetic map and QTL analysis of fruit-related traits in Zucchini using Genotyping-by-sequencing. *BMC Genomics* 18, 94. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3439-y>
- Mousavi, S.R., Rahmati-Joneidabad, M., Noshad, M., 2021. Effect of chia seed mucilage/bacterial cellulose edible coating on bioactive compounds and antioxidant activity of strawberries during cold storage. *Int. J. Biol. Macromol.* 190, 618–623. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.213>
- Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321–4326. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Naikoo, M.I., Dar, M.I., Raghib, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., Khan, F.A., Naushin, F., 2019. Chapter 9 - Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: an overview, in: Khan, M.I.R., Reddy, P.S., Ferrante, A., Khan, N.A. (Eds.), *Plant Signaling Molecules*. Woodhead Publishing, pp. 157–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>
- Nair, S., Singh, Z., 2009. Chilling injury during storage affects respiration rate and fruit quality in Kensington pride mango fruit. *Acta Hortic.* 737–744. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.820.92>
- Nasr, F., Pateiro, M., Rabiei, V., Razavi, F., Formanek, S., Gohari, G., Lorenzo, J.M., 2021. Chitosan-phenylalanine nanoparticles (Cs-Phe Nps) extend the postharvest life of persimmon (*Diospyros kaki*) fruits under chilling stress. *Coatings* 11, 819. <https://doi.org/10.3390/coatings11070819>
- Nazoori, F., Mollai, S., Sobhani, F., Mirdehghan, S.H., Sahhafi, S.R., 2023. Carboxymethyl cellulose and carnauba wax treatments kept the pomegranate fruit (*Punica granatum* L.) quality during cold storage via improving enzymatic defense system and bioactive compounds. *Sci. Hortic.* 309, 111645. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111645>
- Ngaffo Mekontso, F., Duan, W., Cisse, E.H.M., Chen, T., Xu, X., 2021. Alleviation of postharvest chilling injury of carambola fruit by  $\gamma$ -aminobutyric Acid: Physiological, Biochemical, and Structural Characterization. *Front. Nutr.* 8.
- Njogu, M.K., Yang, F., Li, J., Wang, X., Ogwen, J.O., Chen, J., 2020. A novel mutation in TFL1 homolog sustaining determinate growth in cucumber

- (*Cucumis sativus* L.). Theor. Appl. Genet. 133, 3323–3332. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03671-4>
- Ohshima, A., Shirasawa, K., Matsunaga, H., Negoro, S., Miyatake, K., Yamaguchi, H., Nunome, T., Iwata, H., Fukuoka, H., Hayashi, T., 2017. Bayesian QTL mapping using genome-wide SSR markers and segregating population derived from a cross of two commercial F-1 hybrids of tomato. Theor. Appl. Genet. 130, 1601–1616. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2913-5>
- Olfat, N., Ashoori, M., Saedisomeolia, A., 2022. Riboflavin is an antioxidant: a review update. Br. J. Nutr. 128, 1887–1895. <https://doi.org/10.1017/S0007114521005031>
- Osondu, H.A.A., Akinola, S.A., Shoko, T., Pillai, S.K., Sivakumar, D., 2022. Coating properties, resistance response, molecular mechanisms and anthracnose decay reduction in green skin avocado fruit ('Fuerte') coated with chitosan hydrochloride loaded with functional compounds. Postharvest Biol. Technol. 186, 111812. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111812>
- Osorio, S., Do, P.T., Fernie, A.R., 2012. Profiling primary metabolites of tomato fruit with gas chromatography/mass spectrometry, in: Hardy, N.W., Hall, R.D. (Eds.), Plant Metabolomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 101–109. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-594-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-594-7_7)
- Özdemir, K.S., Gökmen, V., 2017. Extending the shelf-life of pomegranate arils with chitosan-ascorbic acid coating. LWT - Food Sci. Technol. 76, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.057>
- Palma, F., Carvajal, F., Jamilena, M., Garrido, D., 2016. Putrescine treatment increases the antioxidant response and carbohydrate content in zucchini fruit stored at low temperature. Postharvest Biol. Technol. 118, 68–70. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.03.009>
- Palma, F., Carvajal, F., Jamilena, M., Garrido, D., 2014a. Contribution of polyamines and other related metabolites to the maintenance of zucchini fruit quality during cold storage. Plant Physiol. Biochem. 82, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.001>
- Palma, F., Carvajal, F., Lluch, C., Jamilena, M., Garrido, D., 2014b. Changes in carbohydrate content in zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) under low temperature stress. Plant Sci. 217–218, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.004>
- Palma, F., Carvajal, F., Jiménez-Muñoz, R., Pulido, A., Jamilena, M., Garrido, D., 2019. Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid treatment improves the cold tolerance of zucchini fruit during postharvest storage. Plant Physiol. Biochem. 136, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.023>
- Palma, F., Carvajal, F., Ramos, J.M., Jamilena, M., Garrido, D., 2015. Effect of putrescine application on maintenance of zucchini fruit quality during cold storage: Contribution of GABA shunt and other related nitrogen metabolites. Postharvest Biol. Technol. 99, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.08.010>

- Palmieri, L., Arrigoni, R., Blanco, E., Carrari, F., Zanol, M.I., Studart-Guimaraes, C., Fernie, A.R., Palmieri, F., 2006. Molecular identification of an *Arabidopsis* s-adenosylmethionine transporter. Analysis of organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes, and functional characterization. *Plant Physiol.* 142, 855–865. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086975>
- Pan, L., Zhao, X., Chen, M., Fu, Y., Xiang, M., Chen, J., 2020. Effect of exogenous methyl jasmonate treatment on disease resistance of postharvest kiwifruit. *Food Chem.* 305, 125483. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125483>
- Panjai, L., Röhlen-Schmittgen, S., Ellenberger, J., Noga, G., Hunsche, M., Fiebig, A., 2021. Effect of postharvest irradiation with red light on epidermal color and carotenoid concentration in different parts of tomatoes. *J. Food Meas. Charact.* 15, 1737–1746. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00770-0>
- Paris, H.S., Yonash, N., Portnoy, V., Mozees-Daube, N., Tzuri, G., Katzir, N., 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106, 971–978
- Paris, H.S., Lebeda, A., Křistkova, E., Andres, T.C., Nee, M.H., 2012. Parallel evolution under domestication and phenotypic differentiation of the cultivated subspecies of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Econ. Bot.* 66, 71–90. <https://doi.org/10.1007/s12231-012-9186-3>
- Parry, A.D., Horgan, R., 1991. Carotenoids and abscisic acid (ABA) biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 82, 320–326. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00100.x>
- Parveen, A., Ahmar, S., Kamran, M., Malik, Z., Ali, A., Riaz, M., Abbasi, G.H., Khan, M., Sohail, A.B., Rizwan, M., Afzal, S., Ali, S., 2021. Absciscic acid signaling reduced transpiration flow, regulated Na<sup>+</sup> ion homeostasis and antioxidant enzyme activities to induce salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Environ. Technol. Innov.* 24, 101808. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101808>
- Parvin, K., Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Nahar, K., Mohsin, S.M., Fujita, M., 2019. Comparative physiological and biochemical changes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under salt stress and recovery: Role of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Antioxidants* 8, 350. <https://doi.org/10.3390/antiox8090350>
- Pasquariello, M.S., Di Patre, D., Mastrobuoni, F., Zampella, L., Scortichini, M., Petriccione, M., 2015. Influence of postharvest chitosan treatment on enzymatic browning and antioxidant enzyme activity in sweet cherry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 109, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.06.007>
- Pelloux, J., Rustérucci, C., Mellerowicz, E.J., 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* 12, 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.001>

- Pereira, L., Zhang, L., Sapkota, M., Ramos, A., Razifard, H., Caicedo, A.L., van der Knaap, E., 2021. Unraveling the genetics of tomato fruit weight during crop domestication and diversification. *Theor. Appl. Genet.* 134, 3363–3378. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03902-2>
- Pérez-Álvarez, E.P., Ruiz-González, R., Nonell, S., Garde-Cerdán, T., 2019. Riboflavin applications to grapevine leaves and berries blue-light post-harvest treatments modifies grape anthocyanins and amino acids contents. *Food Res. Int.* 122, 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.007>
- Pintos, F., Lemoine, M., Gergoff Grozeff, G., Hasperué, H., Vicente, A., Rodoni, L., 2022. Use of riboflavin to reduce decay and extend the shelf-life of fresh-cut sweet pepper. *Postharvest Biol. Technol.* 188, 111882. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111882>
- Powers, H.J., 2003. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1352–1360. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.6.1352>
- Pujol, M., Alexiou, K.G., Fontaine, A.-S., Mayor, P., Miras, M., Jahrman, T., Garcia-Mas, J., Aranda, M.A., 2019. Mapping cucumber vein yellowing virus resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by using BSA-seq analysis. *Front. Plant Sci.* 10.
- Qian, C., Ji, Z., Zhu, Q., Qi, X., Li, Q., Yin, J., Liu, J., Kan, J., Zhang, M., Jin, C., Xiao, L., 2021. Effects of 1-MCP on proline, polyamine, and nitric oxide metabolism in postharvest peach fruit under chilling stress. *Hortic. Plant J., Abiotic Stresses in Horticultural Plants* 7, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.12.007>
- Quilot, B., Wu, B.H., Kervella, J., Génard, M., Foulongne, M., Moreau, K., 2004. QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between *Prunus persica* cultivars and the wild relative species *P. davidiana*. *Theor. Appl. Genet.* 109, 884–897. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1703-z>
- Ramana Rao, T.V., Baraiya, N.S., Vyas, P.B., Patel, D.M., 2016. Composite coating of alginate-olive oil enriched with antioxidants enhances postharvest quality and shelf life of Ber fruit (*Ziziphus mauritiana* Lamk. Var. Gola). *J. Food Sci. Technol.* 53, 748–756. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2045-3>
- Ramos, A., Fu, Y., Michael, V., Meru, G., 2020. QTL-seq for identification of loci associated with resistance to *Phytophthora* crown rot in squash. *Sci. Rep.* 10, 5326. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62228-z>
- Rasheed, H., Ahmad, D., Bao, J., 2022. Genetic diversity and health properties of polyphenols in potato. *Antioxidants* 11, 603. <https://doi.org/10.3390/antiox11040603>
- Rathinasabapathi, B., 2000. Metabolic engineering for stress tolerance: Installing osmoprotectant synthesis pathways. *Ann. Bot.* 86, 709–716. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1254>
- Rawat, N., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A., 2021. Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study

- the same. *Physiol. Plant.* 171, 653–676. <https://doi.org/10.1111/ppl.13217>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rey, F., Zacarías, L., Rodrigo, M.J., 2020. Carotenoids, vitamin C, and antioxidant capacity in the peel of mandarin fruit in relation to the susceptibility to chilling injury during postharvest cold storage. *Antioxidants* 9, 1296. <https://doi.org/10.3390/antiox9121296>
- Ribeiro, T.P., Lima, M.A.C. de, Trindade, D.C.G. da, Santos, A.C.N. dos, Amariz, A., 2009. Use of dextrin-based coatings on postharvest conservation of “Tommy Atkins” mango fruit. *Rev. Bras. Frutic.* 31, 343–351.
- Ricelli, A., Gionfra, F., Percario, Z., De Angelis, M., Primitivo, L., Bonfantini, V., Antonioletti, R., Bullitta, S.M., Saso, L., Incerpi, S., Pedersen, J.Z., 2020. Antioxidant and biological activities of hydroxytyrosol and homovanillic alcohol obtained from olive mill wastewaters of extra-virgin olive oil production. *J. Agric. Food Chem.* 68, 15428–15439. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05230>
- Rivera-Pérez, A., García-Pérez, P., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Lucini, L., 2023. UHPLC-QTOF-HRMS metabolomics insight on the origin and processing authentication of thyme by comprehensive fingerprinting and chemometrics. *Food Chem.* 407, 135123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135123>
- Rodrigues, A.S., Pérez-Gregorio, M.R., García-Falcón, M.S., Simal-Gándara, J., Almeida, D.P.F., 2010. Effect of post-harvest practices on flavonoid content of red and white onion cultivars. *Food Control* 21, 878–884. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.12.003>
- Şahin, S., Bilgin, M., 2018. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *J. Sci. Food Agric.* 98, 1271–1279. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8619>
- Sala, J.M., Lafuente, M.T., 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00115-0)
- Sala, J.M., Sanchez-Ballesta, M.T., Alférez, F., Mulas, M., Zacarias, L., Lafuente, M.T., 2005. A comparative study of the postharvest performance of an ABA-deficient mutant of oranges: II. Antioxidant enzymatic system and phenylalanine ammonia-lyase in non-chilling and chilling peel disorders of citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 37, 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.05.006>
- Saleem, M.S., Ejaz, S., Anjum, M.A., Nawaz, A., Naz, S., Hussain, S., Ali, S., Canan, İ., 2020. Postharvest application of gum arabic edible coating delays ripening and maintains quality of persimmon fruits during storage. *J. Food Process. Preserv.* 44, e14583. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14583>

- Salek, R.M., Steinbeck, C., Viant, M.R., Goodacre, R., Dunn, W.B., 2013. The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *GigaScience* 2, 2047-217X-2–13. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-13>
- Sandhu, A.K., Gray, D.J., Lu, J., Gu, L., 2011. Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol contents of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) skins. *Food Chem.* 126, 982–988. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.105>
- Sandoval, F.J., Zhang, Y., Roje, S., 2008. Flavin nucleotide metabolism in plants: monofunctional enzymes synthesize FAD in plastids. *J. Biol. Chem.* 283, 30890–30900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803416200>
- Santin, M., Lucini, L., Castagna, A., Rocchetti, G., Hauser, M.-T., Ranieri, A., 2019. Comparative “phenol-omics” and gene expression analyses in peach (*Prunus persica*) skin in response to different postharvest UV-B treatments. *Plant Physiol. Biochem.* 135, 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.11.009>
- Santin, M., Ranieri, A., Hauser, M.-T., Miras-Moreno, B., Rocchetti, G., Lucini, L., Strid, Å., Castagna, A., 2021. The outer influences the inner: Postharvest UV-B irradiation modulates peach flesh metabolome although shielded by the skin. *Food Chem.* 338, 127782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127782>
- Sanzani, S.M., Schena, L., De Girolamo, A., Ippolito, A., González-Candelas, L., 2010. Characterization of genes associated with induced resistance against *Penicillium expansum* in apple fruit treated with quercetin. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.11.010>
- Sato, T., Kiuchi, F., Sankawa, U., 1982. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. *Phytochemistry* 21, 845–850. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)80077-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)80077-0)
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., 2011. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chem.* 124, 964–970. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.036>
- Scherer, G.F.E., Ryu, S.B., Wang, X., Matos, A.R., Heitz, T., 2010. Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends Plant Sci.* 15, 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.09.005>
- Schwach, E., Avérous, L., 2004. Starch-based biodegradable blends: morphology and interface properties. *Polym. Int.* 53, 2115–2124. <https://doi.org/10.1002/pi.1636>
- Sevillano, L., Sanchez-Ballesta, M.T., Romojaro, F., Flores, F.B., 2009. Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. *Postharvest technologies applied to*

- reduce its impact. J. Sci. Food Agric. 89, 555–573.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.3468>
- Shan, X., Zhang, W., Yu, F., Wang, S., Li, J., Tang, J., Dai, Z., 2019. Genome-wide analysis of basic helix–loop–helix superfamily members reveals organization and chilling-responsive patterns in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). Genes 10, 914.  
<https://doi.org/10.3390/genes10110914>
- Shankar, S., Khodaei, D., Lacroix, M., 2021. Effect of chitosan/essential oils/silver nanoparticles composite films packaging and gamma irradiation on shelf life of strawberries. Food Hydrocoll. 117, 106750.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106750>
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. J. Bot. 2012, 1–26.  
<https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sharma, S., Barman, K., Prasad, R.N., Singh, J., 2020. Chilling stress during postharvest storage of fruits and vegetables, in: Rakshit, A., Singh, H.B., Singh, A.K., Singh, U.S., Fraceto, L. (Eds.), New Frontiers in Stress Management for Durable Agriculture. Springer, Singapore, pp. 75–99. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1322-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1322-0_6)
- Shiekh, K.A., Ngiwngam, K., Tongdeesontorn, W., 2022. Polysaccharide-based active coatings incorporated with bioactive compounds for reducing postharvest losses of fresh fruits. Coatings 12, 8.  
<https://doi.org/10.3390/coatings12010008>
- Shiekh, R.A., Malik, M.A., Al-Thabaiti, S.A., Shiekh, M.A., 2013. Chitosan as a novel edible coating for fresh fruits. Food Sci. Technol. Res. 19, 139–155. <https://doi.org/10.3136/fstr.19.139>
- Shu, P., Li, Y., Xiang, L., Sheng, J., Shen, L., 2022. Ethylene enhances tolerance to chilling stress in tomato fruit partially through the synergistic regulation between antioxidant enzymes and ATP synthases. Postharvest Biol. Technol. 193, 112065.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112065>
- Siboza, X.I., Bertling, I., Odindo, A.O., 2014. Salicylic acid and methyl jasmonate improve chilling tolerance in cold-stored lemon fruit (*Citrus limon*). J. Plant Physiol. 171, 1722–1731.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.05.012>
- Singleton, V.L., Rossi, J.R., 1965. Shoot tip culture in mango, influence of medium genotype explants factors, seasons and decontamination on phenolic exudation explants survival and axenic culture establishment. Am. J. Enol. Vitic. 16, 144–158.
- Sipahi, R.E., Castell-Perez, M.E., Moreira, R.G., Gomes, C., Castillo, A., 2013. Improved multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of fresh-cut watermelon (*Citrullus lanatus*). LWT - Food Sci. Technol. 51, 9–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.013>

- Smirnoff, N., Wheeler, G.L., 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19, 267–290. <https://doi.org/10.1080/07352680091139231>
- Smith, B.D., 2006. Eastern North America as an independent center of plant domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12223–12228.
- Soleimani, B., Lehnert, H., Babben, S., Keilwagen, J., Koch, M., Arana-Ceballos, F.A., Chesnokov, Y., Pshenichnikova, T., Schondelmaier, J., Ordon, F., Börner, A., Perovic, D., 2022. Genome wide association study of frost tolerance in wheat. *Sci. Rep.* 12, 5275. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08706-y>
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2563–2606. <https://doi.org/10.1021/cr950046o>
- Sothornvit, R., Krochta, J.M., 2005. 23 - Plasticizers in edible films and coatings, in: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging, Food Science and Technology*. Academic Press, London, pp. 403–433. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50055-3>
- Sothornvit, R., Krochta, J.M., 2001. Plasticizer effect on mechanical properties of  $\beta$ -lactoglobulin films. *J. Food Eng.* 50, 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00237-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00237-5)
- Su, W., Ren, Y., Wang, D., Su, Y., Feng, J., Zhang, C., Tang, H., Xu, L., Muhammad, K., Que, Y., 2020. The alcohol dehydrogenase gene family in sugarcane and its involvement in cold stress regulation. *BMC Genomics* 21, 521. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06929-9>
- Sun, H., Luo, M., Zhou, X., Zhou, Q., Ji, S., 2020. Influence of melatonin treatment on peel browning of cold-stored “Nanguo” Pears. *Food Bioprocess Technol.* 13, 1478–1490. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02489-8>
- Sun, H., Wu, S., Zhang, G., Jiao, C., Guo, S., Ren, Y., Zhang, J., Zhang, H., Gong, G., Jia, Z., Zhang, F., Tian, J., Lucas, W.J., Doyle, J.J., Li, H., Fei, Z., Xu, Y., 2017. Karyotype stability and unbiased fractionation in the paleo-allotetraploid *Cucurbita* genomes. *Mol. Plant* 10, 1293–1306. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.003>
- Sun, Y., Yu, D., 2015. Activated expression of AtWRKY53 negatively regulates drought tolerance by mediating stomatal movement. *Plant Cell Rep.* 34, 1295–1306. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1787-8>
- Suresh, S.N., Puspharaj, C., Subramani, R., 2022. Development of Almond gum/alginate composites to enhance the shelf-life of post-harvest *Solanum Lycopersicum* L. *Food Hydrocoll. Health* 2, 100087. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100087>
- Swallah, M.S., Sun, H., Affoh, R., Fu, H., Yu, H., 2020. Antioxidant potential overviews of secondary metabolites (polyphenols) in Fruits. *Int. J. Food Sci.* 2020, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/9081686>
- Taheri, P., Tarighi, S., 2011. A survey on basal resistance and riboflavin-induced defense responses of sugar beet against *Rhizoctonia solani*. *J.*

- Plant Physiol. 168, 1114–1122.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.001>
- Taheri, P., Tarighi, S., 2010. Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. J. Plant Physiol. 167, 201–208.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.08.003>
- Takagi, H., Abe, A., Yoshida, K., Kosugi, S., Natsume, S., Mitsuoka, C., Uemura, A., Utsushi, H., Tamiru, M., Takuno, S., Innan, H., Cano, L.M., Kamoun, S., Terauchi, R., 2013. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. Plant J. 74, 174–183.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.12105>
- Takahashi, D., Johnson, K.L., Hao, P., Tuong, T., Erban, A., Sampathkumar, A., Basic, A., Livingston III, D.P., Kopka, J., Kuroha, T., Yokoyama, R., Nishitani, K., Zuther, E., Hinch, D.K., 2021. Cell wall modification by the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase XTH19 influences freezing tolerance after cold and sub-zero acclimation. Plant Cell Environ. 44, 915–930.  
<https://doi.org/10.1111/pce.13953>
- Tan, W.-J., Yang, Y.-C., Zhou, Y., Huang, L.-P., Xu, L., Chen, Q.-F., Yu, L.-J., Xiao, S., 2018. Diacylglycerol acyltransferase and diacylglycerol kinase modulate triacylglycerol and phosphatidic acid production in the plant response to freezing stress. Plant Physiol. 177, 1303–1318.  
<https://doi.org/10.1104/pp.18.00402>
- Tang, Jiaqi, Tian, X., Mei, E., He, M., Gao, J., Yu, J., Xu, M., Liu, J., Song, L., Li, X., Wang, Z., Guan, Q., Zhao, Z., Wang, C., Bu, Q., 2022. WRKY53 negatively regulates rice cold tolerance at the booting stage by fine-tuning anther gibberellin levels. Plant Cell 34, 4495–4515.  
<https://doi.org/10.1093/plcell/koac253>
- Tang, Jixing, Zhao, Y., Qi, S., Dai, Q., Lin, Q., Duan, Y., 2022. Absciscic acid alleviates chilling injury in cold-stored peach fruit by regulating ethylene and hydrogen peroxide metabolism. Front. Plant Sci. 13, 987573. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.987573>
- Tao, S., Pan, Y., 2023. Reduced degradation of the cell wall polysaccharides maintains higher tissue integrity of papaya (*Carica papaya* L.) during chilling storage. Postharvest Biol. Technol. 204, 112446.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112446>
- Tao, X., Wu, Q., Aalim, H., Li, L., Mao, L., Luo, Z., Ying, T., 2020. Effects of exogenous absciscic acid on bioactive components and antioxidant capacity of postharvest tomato during ripening. Molecules 25, 1346.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25061346>
- Tavarini, S., Degl'Innocenti, E., Remorini, D., Massai, R., Guidi, L., 2008. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. Food Chem. 107, 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.015>

- Thakur, K., Tomar, S.K., Singh, A.K., Mandal, S., Arora, S., 2017. Riboflavin and health: A review of recent human research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 3650–3660. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1145104>
- Thakur, R., Pristijono, P., Scarlett, C.J., Bowyer, M., Singh, S.P., Vuong, Q.V., 2019. Starch-based edible coating formulation: Optimization and its application to improve the postharvest quality of “Cripps pink” apple under different temperature regimes. *Food Packag. Shelf Life* 22, 100409. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100409>
- TianHu, S., Hui, Y., HongBo, C., Yazdani, M., Tadmor, Y., Li, L., 2018. Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Mol. Plant* 11, 58–74.
- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 81, 853–876. <https://doi.org/10.1002/jsfa.885>
- Torabi, A., Mohebbi, M., Tabatabaei-Yazdi, F., Shahidi, F., Khalilian-Movahhed, M., Zahedi, Y., 2020. Application of different carbohydrates to produce squash puree based edible sheet. *J. Food Sci. Technol.* 57, 673–682. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04099-5>
- Trejo-Márquez, M.A., Ramírez-Villatoro, G., Camacho de la Rosa, N.A., 2010. Polyphenol oxidase and peroxidase activities in mangoes stored at chilling temperature. *Acta Hortic.* 395–402. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.864.54>
- Uluşik, S., Seymour, G.B., 2020. Pectate lyases: Their role in plants and importance in fruit ripening. *Food Chem.* 309, 125559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125559>
- Valenzuela, J.L., Manzano, S., Palma, F., Carvajal, F., Garrido, D., Jamilena, M., 2017. Oxidative stress associated with chilling injury in immature fruit: postharvest technological and biotechnological solutions. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1467. <https://doi.org/10.3390/ijms18071467>
- Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M., 2013. Effects of alginate edible coating on preserving fruit quality in four plum cultivars during postharvest storage. *Postharvest Biol. Technol.* 77, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.10.011>
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2006. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan–oleic acid edible coatings. *Postharvest Biol. Technol.* 41, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.03.016>
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J.-K., 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45, 523–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x>
- Vieira, T.M., Moldão-Martins, M., Alves, V.D., 2021. Composite coatings of chitosan and alginate emulsions with olive oil to enhance postharvest quality and shelf life of fresh figs (*Ficus carica* L. cv. ‘Pingo De Mel’). *Foods* 10, 718. <https://doi.org/10.3390/foods10040718>

- Vighi, I.L., Crizel, R.L., Perin, E.C., Rombaldi, C.V., Galli, V., 2019. Crosstalk during fruit ripening and stress response among abscisic acid, calcium-dependent protein kinase and phenylpropanoid. *Crit. Rev. Plant Sci.* 38, 99–116. <https://doi.org/10.1080/07352689.2019.1602959>
- Villalobos-González, L., Peña-Neira, A., Ibáñez, F., Pastenes, C., 2016. Long-term effects of abscisic acid (ABA) on the grape berry phenylpropanoid pathway: Gene expression and metabolite content. *Plant Physiol. Biochem.* 105, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.012>
- Vithana, M.D., Singh, Z., Johnson, S.K., 2018. Dynamics in the concentrations of health-promoting compounds: lupeol, mangiferin and different phenolic acids during postharvest ripening of mango fruit. *J. Sci. Food Agric.* 98, 1460–1468. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8614>
- Wang, B., Wu, C., Wang, G., He, J., Zhu, S., 2021. Transcriptomic analysis reveals a role of phenylpropanoid pathway in the enhancement of chilling tolerance by pre-storage cold acclimation in cucumber fruit. *Sci. Hortic.* 288, 110282. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110282>
- Wang, C.Y., 1995. Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharvest Biol. Technol.* 5, 67–76. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(94\)00020-S](https://doi.org/10.1016/0925-5214(94)00020-S)
- Wang, C.Y., Ji, Z.L., 1989. Effect of low-oxygen storage on chilling injury and polyamines in Zucchini squash. *Sci. Hortic.* 39, 1–7. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90031-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90031-9)
- Wang, C.Y., Kramer, G.F., Whitaker, B.D., Lusby, W.R., 1992. Temperature preconditioning increases tolerance to chilling injury and alters lipid composition in Zucchini squash. *J. Plant Physiol.* 140, 229–235. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80940-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80940-5)
- Wang, C.Y., Qi, L., 1997. Modified atmosphere packaging alleviates chilling injury in cucumbers. *Postharvest Biol. Technol.* 10, 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(97\)01405-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(97)01405-1)
- Wang, L., Chen, S., Shao, J., Zhang, C., Mei, L., Wang, K., Jin, P., Zheng, Y., 2022. Hydrogen sulfide alleviates chilling injury in peach fruit by maintaining cell structure integrity via regulating endogenous H<sub>2</sub>S, antioxidant and cell wall metabolisms. *Food Chem.* 391, 133283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133283>
- Wang, L., Huang, X., Liu, C., Zhang, C., Shi, K., Wang, M., Wang, Y., Song, Q., Chen, X., Jin, P., Zheng, Y., 2023. Hydrogen sulfide alleviates chilling injury by modulating respiration and energy metabolisms in cold-stored peach fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 199, 112291. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112291>
- Wang, L., Shan, T., Xie, B., Ling, C., Shao, S., Jin, P., Zheng, Y., 2019. Glycine betaine reduces chilling injury in peach fruit by enhancing phenolic and sugar metabolisms. *Food Chem.* 272, 530–538. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.085>

- Wang, L., Wang, Y., Hou, Y., Zhu, X., Zheng, Y., Jin, P., 2021. Physiological and metabolomic analyses of hot water treatment on amino acids and phenolic metabolisms in peach cold tolerance. *Postharvest Biol. Technol.* 179, 111593. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111593>
- Wang, S.Y., Gao, H., 2013. Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *LWT - Food Sci. Technol., Strawberries* 52, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.003>
- Wang, Z.-G., Guo, L.-L., Ji, X.-R., Yu, Y.-H., Zhang, G.-H., Guo, D.-L., 2019. Transcriptional analysis of the early ripening of ‘Kyoho’ grape in response to the treatment of riboflavin. *Genes* 10, 514. <https://doi.org/10.3390/genes10070514>
- Watanabe, M., Chiba, Y., Hirai, M.Y., 2021. Metabolism and regulatory functions of O-acetylserine, S-adenosylmethionine, homocysteine, and serine in plant development and environmental responses. *Front. Plant Sci.* 12.
- Wu, H.-C., Bulgakov, V.P., Jinn, T.-L., 2018. Pectin Methylesterases: Cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress. *Front. Plant Sci.* 9.
- Xie, B., Ling, C., Hu, S., Hou, Y., Zheng, Y., Jin, P., 2021. CaM enhances chilling tolerance of peach fruit by regulating energy and GABA metabolism. *Postharvest Biol. Technol.* 181, 111691. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111691>
- Xie, F., Yuan, S., Pan, H., Wang, R., Cao, J., Jiang, W., 2017. Effect of yeast mannan treatments on ripening progress and modification of cell wall polysaccharides in tomato fruit. *Food Chem.* 218, 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.086>
- Xu, D., Lam, S.M., Zuo, J., Yuan, S., Lv, J., Shi, J., Gao, L., Chen, B., Sui, Y., Shui, G., Geng, S., Wang, Q., 2021. Lipidomics reveals the difference of membrane lipid catabolism between chilling injury sensitive and non-sensitive green bell pepper in response to chilling. *Postharvest Biol. Technol.* 182, 111714. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111714>
- Xu, W., Zhang, N., Jiao, Y., Li, R., Xiao, D., Wang, Z., 2014. The grapevine basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor positively modulates CBF-pathway and confers tolerance to cold-stress in Arabidopsis. *Mol. Biol. Rep.* 41, 5329–5342. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3404-2>
- Xu, X., Wan, W., Jiang, G., Xi, Y., Huang, H., Cai, J., Chang, Y., Duan, C.-G., Mangrauthia, S.K., Peng, X., Zhu, J.-K., Zhu, G., 2019. Nucleocytoplasmic trafficking of the arabidopsis WD40 repeat protein XIW1 regulates ABI5 stability and abscisic acid responses. *Mol. Plant* 12, 1598–1611. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.07.001>

- Yamazaki, M., Ishida, A., Suzuki, Y., Aoki, Y., Suzuki, S., Enoki, S., 2021. Ethylene induced by sound stimulation enhances anthocyanin accumulation in grape berry skin through direct upregulation of UDP-Glucose: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase. *Cells* 10, 2799. <https://doi.org/10.3390/cells10102799>
- Yan, J., Luo, Z., Ban, Z., Lu, H., Li, D., Yang, D., Aghdam, M.S., Li, L., 2019. The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 147, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.09.002>
- Yang, C., Lee, F.-W., Cheng, Y.-J., Chu, Y.-Y., Chen, C.-N., Kuan, Y.-C., 2023. Chitosan coating formulated with citric acid and pomelo extract retards pericarp browning and fungal decay to extend shelf life of cold-stored lychee. *Sci. Hortic.* 310, 111735. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111735>
- Yang, D., Liu, Q., Gao, Y., Wan, S., Meng, F., Weng, W., Zhang, Y., 2023. Characterization of silver nanoparticles loaded chitosan/polyvinyl alcohol antibacterial films for food packaging. *Food Hydrocoll.* 136, 108305. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108305>
- Yao, M., Ge, W., Zhou, Q., Zhou, X., Luo, M., Zhao, Y., Wei, B., Ji, S., 2021. Exogenous glutathione alleviates chilling injury in postharvest bell pepper by modulating the ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle. *Food Chem.* 352, 129458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129458>
- Yao, W., Xu, T., Farooq, S.U., Jin, P., Zheng, Y., 2018. Glycine betaine treatment alleviates chilling injury in zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) by modulating antioxidant enzymes and membrane fatty acid metabolism. *Postharvest Biol. Technol.* 144, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.05.007>
- Yoruk, R., Marshall, M.R., 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A Review. *J. Food Biochem.* 27, 361–422. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x>
- Yu, J., Wu, S., Sun, H., Wang, X., Tang, X., Guo, S., Zhang, Z., Huang, S., Xu, Y., Weng, Y., Mazourek, M., McGregor, C., Renner, S.S., Branham, S., Kousik, C., Wechter, W.P., Levi, A., Grumet, R., Zheng, Y., Fei, Z., 2023. CuGenDBv2: an updated database for cucurbit genomics. *Nucleic Acids Res.* 51, D1457–D1464. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac921>
- Yu, Q., Liu, Y.-L., Sun, G.-Z., Liu, Y.-X., Chen, J., Zhou, Y.-B., Chen, M., Ma, Y.-Z., Xu, Z.-S., Lan, J.-H., 2021. Genome-Wide analysis of the soybean calmodulin-binding protein 60 family and identification of GmCBP60A-1 responses to drought and salt stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13501. <https://doi.org/10.3390/ijms222413501>
- Yuan, S., Li, W., Li, Q., Wang, L., Cao, J., Jiang, W., 2019. Defense responses, induced by p-coumaric acid and methyl p-coumarate, of Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit against black spot rot caused by *Alternaria*

- alternata*. J. Agric. Food Chem. 67, 2801–2810. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00087>
- Yuan, Y., Zhao, Y., Yang, J., Jiang, Y., Lu, F., Jia, Y., Yang, B., 2017. Metabolomic analyses of banana during postharvest senescence by H-1-high resolution-NMR. Food Chem. 218, 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.080>
- Zaki, N.H.M., Som, H.Z.M., Haiyee, Z.A., 2012. Application of palm stearin-chitosan edible coating on star fruits (*Averrhoa carambola* L.) 16, 10.
- Zemanová, V., Pavlík, M., Pavlíková, D., Tlustoš, P., 2014. The significance of methionine, histidine and tryptophan in plant responses and adaptation to cadmium stress. Plant Soil Environ. 60 (2014), 426–432. <https://doi.org/10.17221/544/2014-PSE>
- Zha, Z., Tang, R., Wang, C., Li, Y., Liu, S., Wang, L., Wang, K., 2022. Riboflavin inhibits browning of fresh-cut apples by repressing phenolic metabolism and enhancing antioxidant system. Postharvest Biol. Technol. 187, 111867. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111867>
- Zhai, Z., Feng, C., Wang, Y., Sun, Y., Peng, X., Xiao, Y., Zhang, X., Zhou, X., Jiao, J., Wang, W., Du, B., Wang, C., Liu, Y., Li, T., 2021. Genome-wide identification of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) and polygalacturonase (PG) genes and characterization of their role in fruit softening of sweet cherry. Int. J. Mol. Sci. 22, 12331. <https://doi.org/10.3390/ijms222212331>
- Zhang, D., Li, J., Niu, X., Deng, C., Song, X., Li, W., Cheng, Z., Xu, Q., Zhang, B., Guo, W., 2021. GhANN1 modulates the salinity tolerance by regulating ABA biosynthesis, ion homeostasis and phenylpropanoid pathway in cotton. Environ. Exp. Bot. 185, 104427. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104427>
- Zhang, D., Wang, H., Hu, Y., Liu, Y., 2015. Chitosan controls postharvest decay on cherry tomato fruit possibly via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. J. Agric. Food Chem. 63, 7399–7404. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01566>
- Zhang, L., Cao, X., Wang, Z., Zhang, Z., Li, J., Wang, Q., Xu, X., 2022. Brassinolide alleviated chilling injury of banana fruit by regulating unsaturated fatty acids and phenolic compounds. Sci. Hortic. 297, 110922. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110922>
- Zhang, M., Xu, L., Zhang, L., Guo, Y., Qi, X., He, L., 2018. Effects of quercetin on postharvest blue mold control in kiwifruit. Sci. Hortic. 228, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.029>
- Zhang, Q., Tang, F., Cai, W., Peng, B., Ning, M., Shan, C., Yang, X., 2022. Chitosan treatment reduces softening and chilling injury in cold-stored Hami melon by regulating starch and sucrose metabolism. Front. Plant Sci. 13, 1096017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1096017>
- Zhang, Q., Yang, W., Liu, J., Liu, H., Lv, Z., Zhang, C., Chen, D., Jiao, Z., 2021. Postharvest UV-C irradiation increased the flavonoids and anthocyanins accumulation, phenylpropanoid pathway gene

- expression, and antioxidant activity in sweet cherries (*Prunus avium* L.). Postharvest Biol. Technol. 175, 111490. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111490>
- Zhang, X., Liu, T., Zhu, S., Wang, D., Sun, S., Xin, L., 2022. Short-term hypobaric treatment alleviates chilling injury by regulating membrane fatty acids metabolism in peach fruit. J. Food Biochem. 46, e14113. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14113>
- Zhang, X., Wang, M., Gan, C., Ren, Y., Zhao, X., Yuan, Z., 2023. Riboflavin application delays senescence and relieves decay in harvested strawberries during cold storage by improving antioxidant system. LWT 182, 114810. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114810>
- Zhao, J., Ao, M., He, X., Li, W., Deng, L., Zeng, K., Ming, J., 2022. Changes in phenolic content, composition, and antioxidant activity of blood oranges during cold and on-tree storage. J. Integr. Agric. 21, 3669–3683. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.09.011>
- Zhao, Y., Tang, J., Brummell, D.A., Song, C., Qi, S., Lin, Q., Bi, J., Duan, Y., 2022. Absciscic acid alleviates chilling injury in cold-stored peach fruit by regulating the metabolism of sucrose. Sci. Hortic. 298, 111000. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111000>
- Zhao, Z., Moghadasian, M.H., 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. Food Chem. 109, 691–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.039>
- Zheng, H., Liu, W., Liu, S., Liu, C., Zheng, L., 2019. Effects of melatonin treatment on the enzymatic browning and nutritional quality of fresh-cut pear fruit. Food Chem. 299, 125116. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125116>
- Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J. Agric. Food Chem. 49, 5165–5170. <https://doi.org/10.1021/jf010697n>
- Zheng, Y., Luo, L., Wei, J., Chen, Q., Yang, Y., Hu, X., Kong, X., 2018. The glutamate receptors AtGLR1.2 and AtGLR1.3 increase cold tolerance by regulating jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 506, 895–900. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.153>
- Zou, C., Wang, P., Xu, Y., 2016. Bulk sample analysis in genetics, genomics and crop improvement. Plant Biotechnol. J. 14, 1941–1955. <https://doi.org/10.1111/pbi.12559>
- Zuo, X., Cao, S., Zhang, M., Cheng, Z., Cao, T., Jin, P., Zheng, Y., 2021. High relative humidity (HRH) storage alleviates chilling injury of zucchini fruit by promoting the accumulation of proline and ABA. Postharvest Biol. Technol. 171, 111344. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111344>



