



## **UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

---

# **EFFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LA CALIDAD EN LA VIDA POSCOSECHA DE FRUTOS DE CALABACÍN (*Cucurbita pepo ssp. pepo* L.)**

---

**ALUMNO: D. Juan María García Galiano**

**DIRECTORES:**

**Dr. Juan Luis Valenzuela Manjón-Cabeza**

**Dña. Zoraida Megías Sierra**

**Almería, Junio de 2014**

*Gracias a mis directores por su atención, dedicación y ayuda constantes, al personal de laboratorio, en especial a Carmen, así como a Javier, compañero de estudios y amigo, por su colaboración y apoyo durante las largas jornadas de trabajo, y a todas las personas que de alguna manera han hecho posible la realización de este trabajo; pero sobre todo, y como siempre, gracias a mi familia por su apoyo, paciencia y comprensión en todo momento.*

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTERÉS Y OBJETIVOS</b>                       | <b>12</b> |
| 1.1. Importancia del cultivo del calabacín          | 12        |
| 1.1.1. Situación a nivel mundial                    | 12        |
| 1.1.2. Situación a nivel nacional                   | 14        |
| 1.1.3. Situación a nivel regional                   | 15        |
| 1.2. Interés de la investigación                    | 16        |
| 1.3. Objetivos                                      | 18        |
| <b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>                    | <b>20</b> |
| 2.1 Origen del calabacín.                           | 20        |
| 2.2 Taxonomía del calabacín                         | 20        |
| 2.3 Morfología y características del fruto          | 22        |
| 2.4 Recolección y comercialización del calabacín    | 24        |
| 2.4.1 Normas de calidad para el calabacín           | 24        |
| 2.5 Tecnología poscosecha                           | 30        |
| 2.5.1 Almacenamiento de los frutos en refrigeración | 30        |
| 2.5.1.1 Daños por frío                              | 31        |
| 2.5.1.2 Síntomas de los daños por frío              | 34        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.5.2 Factores que intervienen en la senescencia de los frutos en poscosecha | 35        |
| 2.5.2.1 Producción de etileno  | 36        |
| 2.5.2.2 Respiración  | 38        |
| 2.5.2.3 Transpiración  | 39        |
| 2.5.2.4 Cambios en la composición  | 40        |
| 2.5.2.5 Desórdenes fisiológicos  | 41        |
| 2.5.2.6 Daños físicos  | 42        |
| 2.5.2.7 Desórdenes patológicos   | 43        |
| 2.5.3 Estrés oxidativo   | 43        |
| 2.5.3.1 Lipoperoxidación   | 44        |
| 2.5.4 Tratamientos en poscosecha   | 47        |
| 2.5.4.1 Tratamientos térmicos  | 47        |
| 2.5.4.2 Tratamientos químicos  | 50        |
| 2.5.4.3 Tratamientos gaseosos. Atmósferas Modificadas                        | 53        |
| <b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>   | <b>58</b> |
| 3.1 Localización del ensayo  | 58        |
| 3.2 Material vegetal   | 58        |
| 3.3 Tratamientos   | 59        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.4       | Diseño experimental  | 60        |
| 3.5       | Parámetros medidos en el ensayo                              | 60        |
| 3.5.1     | Daños por frío   | 60        |
| 3.5.2     | Producción de etileno  | 61        |
| 3.5.3     | Respiración  | 62        |
| 3.5.4     | Pérdida de peso  | 63        |
| 3.5.5     | Actividad oxidativa  | 64        |
| 3.5.5.1   | Peróxido de hidrógeno  | 66        |
| 3.5.5.2   | Malondialdehído  | 67        |
| 3.5.6     | Evaluación de la firmeza                                     | 69        |
| 3.5.7     | Contenido en clorofilas del exocarpo                         | 71        |
| 3.5.8     | Análisis estadístico   | 74        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                                | <b>76</b> |
| 4.1       | Efectos de los tratamientos sobre los daños por frío         | 76        |
| 4.2       | Efectos de los tratamientos en la pérdida de peso            | 80        |
| 4.3       | Efectos de los tratamientos en la producción de etileno      | 82        |
| 4.4       | Efectos de los tratamientos sobre la respiración             | 86        |
| 4.5       | Efectos de los tratamientos sobre la firmeza                 | 90        |
| 4.6       | Efectos de los tratamientos sobre el contenido en clorofilas | 92        |
| 4.7       | Efectos de los tratamientos sobre el estrés oxidativo        | 101       |
| 4.7.1     | Efectos en el contenido en peróxido de hidrógeno             | 102       |

---

|   |            |
|---|------------|
| 4.7.1.1 Comparación del contenido de peróxido de hidrógeno entre variedades | 105        |
| 4.7.2 Efectos en el contenido en malondialdehído                            | 107        |
| 4.7.2.1 Comparación del contenido en malondialdehído entre variedades       | 110        |
| <b>5. CONCLUSIONES</b>  | <b>114</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>  | <b>116</b> |

# Índice de figuras, gráficas y tablas

## Figuras

| Número | Nombre  | Página |
|--------|---|--------|
| 1.1    | Evolución de la producción mundial de calabaza, calabacín y calabaza confitera desde 1996 | 12     |
| 1.2    | Principales países exportadores a nivel mundial en el año 2012                            | 13     |
| 1.3    | Evolución de la superficie de calabacín en España   | 14     |
| 1.4    | Distribución porcentual de la producción de calabacín en España                           | 15     |
| 1.5    | Distribución de la producción de calabacín en Andalucía                                   | 15     |
| 2.1    | Detalle de sección de un fruto de calabacín   | 23     |
| 2.2    | Daños por frío en calabacín   | 35     |
| 2.3    | Destrucción de los lípidos de la membrana celular por lipoperoxidación.                   | 45     |
| 2.4    | Lipoperoxidación de un ácido graso y formación de MDA                                     | 46     |
| 2.5    | Reacción con TBA para determinar el contenido en MDA                                      | 46     |
| 3.1    | Medición de etileno en el cromatógrafo  | 61     |
| 3.2    | Medición de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub>  | 62     |
| 3.3    | Pesado de frutos  | 63     |
| 3.4    | Extracción de muestra de exocarpo y conservación en nitrógeno líquido                     | 64     |
| 3.5    | Pulverizado de exocarpo con nitrógeno líquido   | 64     |
| 3.6    | Medición de la absorbancia en lector de placas  | 66     |
| 3.7    | Preparación de la reacción y medición de muestras   | 68     |
| 3.8    | Medida de firmeza de frutos   | 69     |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| <b>3.9</b>  | Representación del perfil de textura de calabacín medido por el texturómetro  | <b>69</b>  |
| <b>3.10</b> | Medición del contenido en clorofilas  | <b>71</b>  |
| <b>3.11</b> | Extracción de clorofila y medida de absorbancia   | <b>72</b>  |
| <b>4.1</b>  | Pitting en calabacín.   | <b>75</b>  |
| <b>4.2</b>  | Índice global de los daños por frío en los frutos conservados durante 4, 7, 11 y 14 días a 4°C  | <b>79</b>  |
| <b>4.3</b>  | Pérdida de peso de los frutos conservados a 4°C durante los 7 y 14 días   | <b>81</b>  |
| <b>4.4</b>  | Producción de etileno de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días  | <b>83</b>  |
| <b>4.5</b>  | Producción de CO <sub>2</sub> de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.   | <b>87</b>  |
| <b>4.6</b>  | Pérdida de firmeza de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días   | <b>90</b>  |
| <b>4.7</b>  | Contenido en clorofilas totales de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días por medida indirecta.                                | <b>91</b>  |
| <b>4.8</b>  | Contenido en carotenos de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días por medida indirecta.   | <b>94</b>  |
| <b>4.9</b>  | Contenido en clorofila de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días por medida directa.   | <b>96</b>  |
| <b>4.10</b> | Contenido en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de los frutos de la variedad <i>Sinatra</i> conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.            | <b>101</b> |
| <b>4.11</b> | Contenido en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de los frutos de la variedad <i>Natura</i> conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.             | <b>103</b> |
| <b>4.12</b> | Comparación del contenido en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de los frutos de las variedades <i>Natura</i> y <i>Sinatra</i> a los 0, 7 y 14 días. | <b>105</b> |
| <b>4.13</b> | Contenido en MDA de los frutos de la variedad <i>Sinatra</i> conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.                                      | <b>107</b> |



|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| <b>4.14</b> | Contenido en MDA de los frutos de la variedad <i>Natura</i> conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.             | <b>108</b> |
| <b>4.15</b> | Comparación del contenido en MDA de los frutos de las variedades <i>Natura</i> y <i>Sinatra</i> a los 0, 7 y 14 días. | <b>110</b> |

## Gráficas

| <b>Número</b> | <b>Nombre</b>  | <b>Página</b> |
|---------------|--|---------------|
| <b>4.1</b>    | Correlación entre la producción de etileno y el índice de DF de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.                     | <b>85</b>     |
| <b>4.2</b>    | Correlación entre la producción de etileno y la producción de CO <sub>2</sub> de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.    | <b>89</b>     |
| <b>4.3</b>    | Correlación entre DF y el contenido en clorofilas de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.                                | <b>94</b>     |
| <b>4.4</b>    | Correlación entre el contenido en clorofilas y el contenido en carotenos de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.         | <b>96</b>     |
| <b>4.5</b>    | Análisis multifactorial del comportamiento en los tratamientos baño 37°C, baño 42°C, CaCl <sub>2</sub> y Acondicionamiento.                  | <b>99</b>     |
| <b>4.6</b>    | Análisis multifactorial del comportamiento en los tratamientos retractilado y difenilamina.  | <b>100</b>    |
| <b>4.7</b>    | Correlación entre el índice de DF y la cantidad de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días. | <b>107</b>    |
| <b>4.8</b>    | Correlación entre el índice de DF y la cantidad de MDA en los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.                           | <b>112</b>    |

## Tablas

| Número | Nombre  | Página |
|--------|---|--------|
| 1.1    | Comparación de la campaña 2012/2013 con la media de las últimas diez campañas               | 16     |
| 2.1    | Clasificación Taxonómica  | 21     |
| 4.1    | Superficie de los daños por frío en los frutos conservados durante 4, 7, 11 y 14 días a 4°C | 77     |
| 4.2    | Gravedad de los daños por frío en los frutos conservados durante 4, 7, 11 y 14 días a 4°C   | 78     |

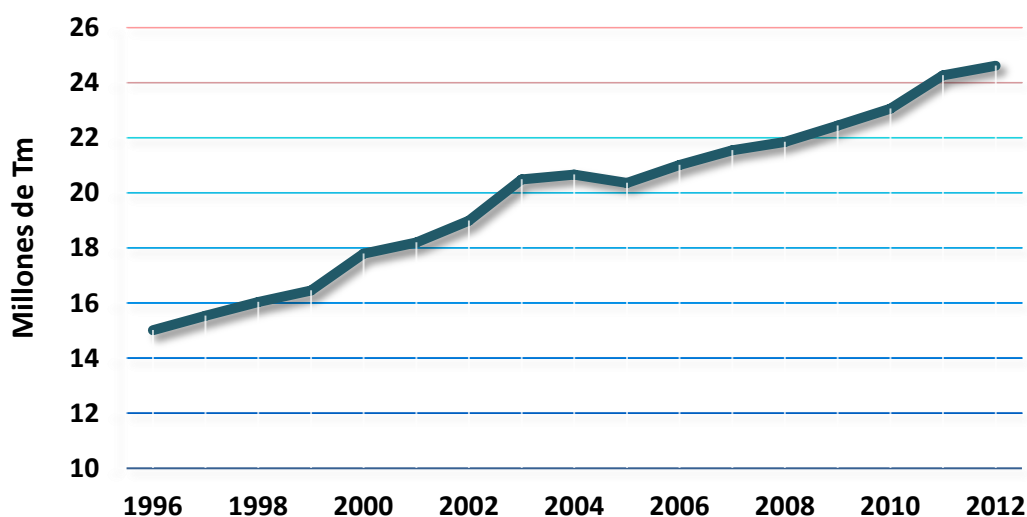
# 1 | Interés y Objetivos

## 1. INTERÉS Y OBJETIVOS

### 1.1 Importancia del cultivo del calabacín

#### 1.1.1 Situación a nivel mundial

El calabacín (fruto de *Cucurbita pepo ssp. pepo* L.) está experimentando una creciente importancia a nivel mundial durante las últimas décadas basándonos en los datos ofrecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (F.A.O.).

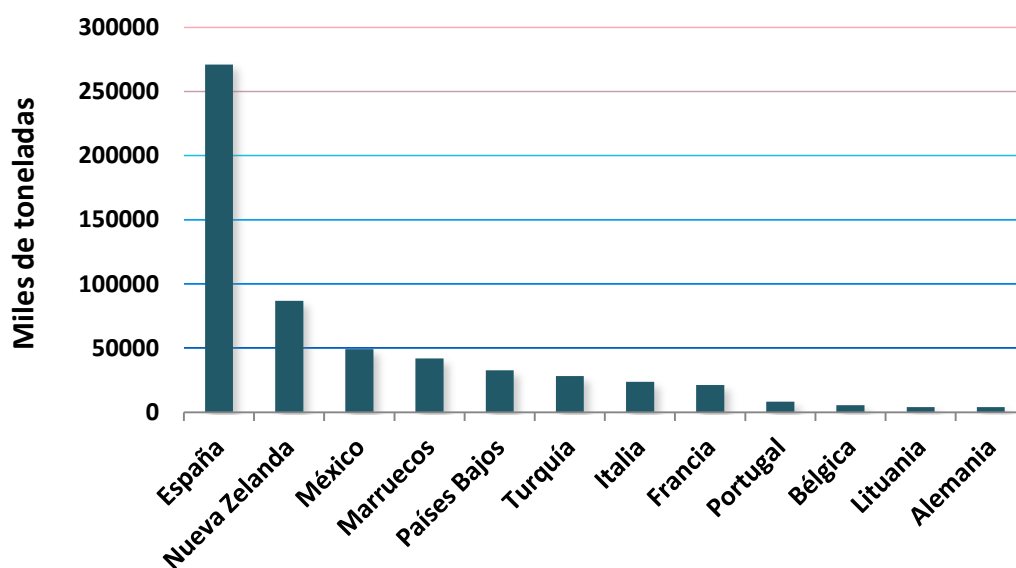


**Figura 1.1. Evolución de la producción mundial de calabaza, calabacín y calabaza confitera desde 1996. Fuente: F.A.O.**

Según dicha organización, los principales países productores de calabazas, calabacines y calabaza confitera en el año 2012 fueron China (7.000.000 Tm), India (4.900.000 Tm) y Rusia (1.080.845 Tm), seguidos de Irán (9.650.000 Tm) y USA (900.880 Tm). España ocupa la novena posición, con una producción de 502.600 Tm.

A nivel europeo, España ocupa la tercera posición en cuanto a producción, por detrás de Ucrania (587.800 Tm) e Italia (520.000 Tm) y seguido de Alemania (110.114 Tm) y Francia (108.998 Tm).

Al igual que la producción, el comercio de éste producto se ha incrementado positivamente en los últimos años. España es el país que más cantidad de calabacín exporta (270.919 Tm) a gran distancia del resto de países según datos de la F.A.O. (2012).

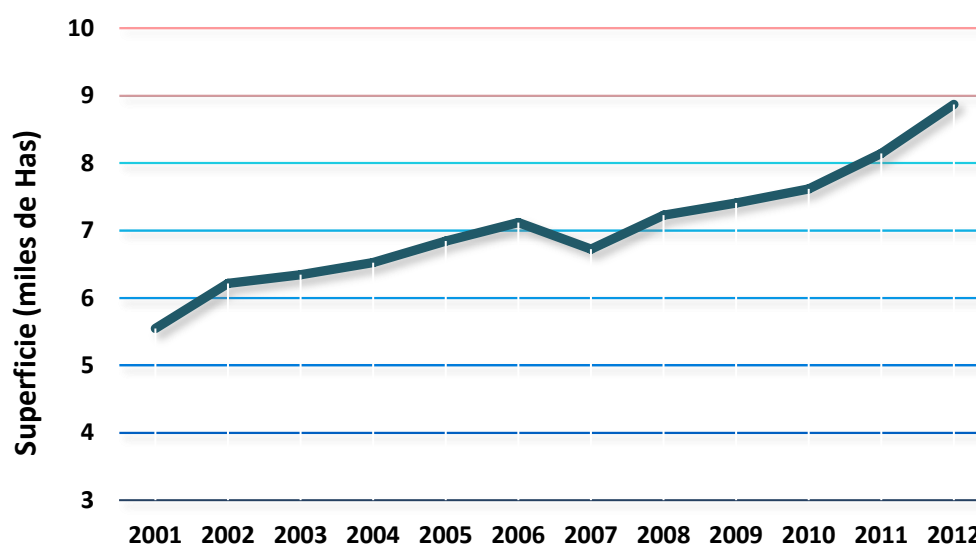


**Figura 1.2. Principales países exportadores a nivel mundial en el año 2012. Fuente: F.A.O.**

En cuanto a importaciones, USA (365.519 Tm), Francia (143.257 Tm), Japón (114.574 Tm), Alemania (69.405 Tm), Reino Unido (41.247 Tm), son por ese orden los países que más calabacín importan. España ocupa la 14<sup>o</sup> posición importando 9.418 Tm.

### 1.1.2 Situación a nivel nacional

Según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (M.A.G.R.A.M.A.), en el año 2012 la superficie cultivada de calabacín en España fue de 8.875 Has, con una producción de 463.777 Tm.



**Figura 1.3. Evolución de la superficie de calabacín en España. Fuente: M.A.G.R.A.M.A. 2013. Elaboración propia.**

La mayor parte del calabacín cultivado en España se hace en invernadero, casi el 70% de la superficie total y casi el 60% de la producción se consigue mediante este sistema de cultivo (M.A.G.R.A.M.A., 2012).

En cuanto a comunidades autónomas, en Andalucía se localiza más del 75% de la superficie total dedicada al cultivo de calabacín a nivel nacional, seguida de Canarias, la Región de Murcia, y Cataluña. En cuanto a producción, casi el 84% del total a nivel nacional se produce en Andalucía, seguida de Canarias, Cataluña y la Región de Murcia.

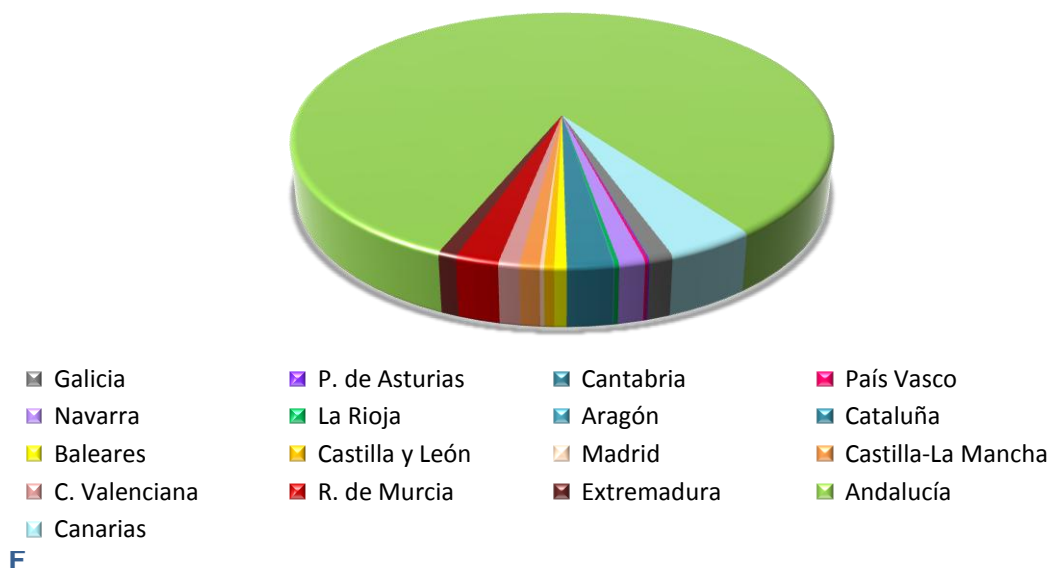


Figura 1.4. Distribución porcentual de la producción de calabacín en España. Fuente: M.A.G.R.A.M.A. (2013). Elaboración propia.

### 1.1.3 Situación a nivel regional

A nivel andaluz, Almería es la provincia que concentra mayoritariamente el cultivo del calabacín, con 5.265 Ha, lo que representa el 86% de la superficie total cultivada en Andalucía (6.123 Ha) y una producción total de casi 300.000 Tm, más del 88% de la producción total andaluza (337.721 Tm) según datos del M.A.G.R.A.M.A. (2013).

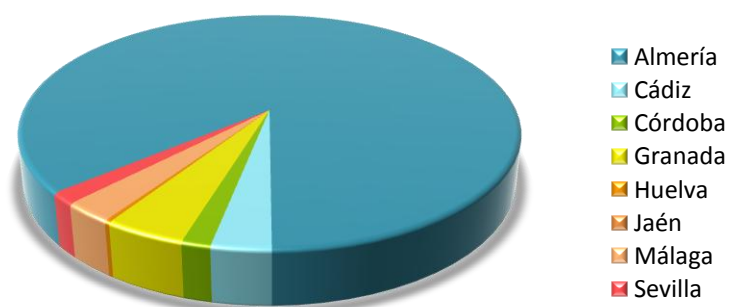


Figura 1.5. Distribución de la producción de calabacín en Andalucía. Fuente: M.A.G.R.A.M.A. (2013). Elaboración propia.

Esto supone que Almería produce entorno al 70% del calabacín que se produce a nivel nacional, siendo el mayor exportador de este producto a nivel mundial, cuyo el destino principal es el resto de países europeos.

A nivel provincial, el calabacín es el quinto producto en cuanto a producción, con un total de 368.584 Tm, por detrás del tomate, pimiento, pepino y sandía, y el cuarto en cuanto a valor, con un valor de la producción de 184.869.000 euros, por detrás del pimiento, tomate y pepino, según datos de la fundación Cajamar (2013).

| Producto    | MEDIA 2004/2013 |               |                     | CAMPAÑA 2012/2013 |               |                     | VARIACIONES PORCENTUALES |               |                     |
|-------------|-----------------|---------------|---------------------|-------------------|---------------|---------------------|--------------------------|---------------|---------------------|
|             | Cantidad (t)    | Precio (€/Kg) | Valor (Miles euros) | Cantidad (t)      | Precio (€/Kg) | Valor (Miles euros) | Cantidad (t)             | Precio (€/Kg) | Valor (miles euros) |
| Berenjena   | 129,682         | 0,47          | 60,394              | 162,357           | 0,57          | 91,79               | 25,2                     | 21,4          | 51,98               |
| Calabacín   | 288,692         | 0,46          | 131,804             | 368,584           | 0,5           | 184,869             | 27,67                    | 9,86          | 40,26               |
| Judía Verde | 22,547          | 1,26          | 58,512              | 18,921            | 1,23          | 23,209              | -16,09                   | -3            | -18,6               |
| Melón       | 166,551         | 0,39          | 65,019              | 134,565           | 0,38          | 50,649              | -19,2                    | -3,58         | -22,1               |
| Pepino      | 360,483         | 0,45          | 162,364             | 421,017           | 0,53          | 221,783             | 16,79                    | 16,96         | 36,6                |
| Pimiento    | 542,958         | 0,7           | 377,866             | 590,516           | 0,71          | 417,041             | 8,76                     | 1,48          | 10,37               |
| Sandía      | 320,334         | 0,29          | 91,327              | 396,878           | 0,29          | 114,241             | 23,9                     | 0,97          | 25,09               |
| Tomate      | 844,21          | 0,49          | 412,333             | 771,536           | 0,46          | 352,8               | -8,61                    | -6,38         | -14,44              |

Tabla 1.1. Comparación de la campaña 2012/2013 con la media de las últimas diez campañas. Fuente: Fundación Cajamar (2013).

## 1.2 Interés de la investigación

El calabacín es un producto de relevancia económica para la provincia de Almería como se observa según los datos expuestos anteriormente, dependiendo la rentabilidad del producto de la vida comercial de los frutos frescos. La mayor parte de la producción se exporta a países del norte de Europa, y es necesario que el producto llegue a su destino en óptimas condiciones de calidad; por eso, la conservación de los frutos y la duración de su vida comercial es un factor de especial importancia en la comercialización.



El fruto de calabacín se cosecha antes de alcanzar la madurez fisiológica, y en general su vida comercial es muy corta. En los frutos recién cosechados se produce una rápida pérdida de agua, que se traduce en la pérdida de firmeza, pérdida de peso y una pérdida de calidad de los mismos, comenzando así la senescencia de los frutos, que progresa rápidamente a menos que se enfríe el producto de inmediato, siendo esta la razón del uso de la refrigeración durante el transporte y almacenamiento de este y de la mayoría de productos hortícolas.

El calabacín es un fruto de origen subtropical, y a pesar de que el almacenamiento en frío puede atenuar y ralentizar los efectos de la senescencia, puede hacer que se manifiesten un conjunto de síntomas que hacen que los frutos pierdan su valor comercial. Estos síntomas se denominan daños por frío (DF) y son desórdenes fisiológicos que ocurren en los frutos de origen tropical o subtropical sometidos a bajas temperaturas superiores al punto de congelación (Martínez-Téllez *et al.*, 2002).

La acción del frío moderado produce unos efectos directos y rápidos sobre las membranas, con la alteración de la célula, cuya gravedad depende de la intensidad y duración de la baja temperatura (Levitt, 1980, citado por Marcellin, 1992), que produce una serie de síntomas visibles en el fruto tales como depresiones de la piel o picado, pardeamientos internos o superficiales, o el debilitamiento de la resistencia a daños mecánicos y al ataque microbiano entre otros (Marcellin, 1992; Artés, 1995). A nivel fisiológico, se observa un aumento de la tasa respiratoria y de la emisión de etileno, reducción de la fotosíntesis, así como la inactivación de algunas enzimas y alteraciones en la membrana y estructura celular (Wang, 2000). En el desarrollo de los DF intervienen una serie de factores genéticos, fisiológicos y bioquímicos además de las condiciones climáticas del cultivo (Bramlage, 1982; Watada, 1982; Luchsinger y Artés, 2000).

Es necesario profundizar en los fundamentos bioquímicos y fisiológicos de este tipo de daños para reducir su gravedad, así como trabajar en la obtención de variedades resistentes al frío, investigar en la aplicación de tratamientos térmicos, químicos y físicos encaminados a la reducción de este tipo de daños, y en la

aplicación de técnicas de cultivo, recolección y poscosecha que faciliten la conservación frigorífica de las cosechas.

### 1.3 Objetivos de la investigación

En éste trabajo de investigación se pretende estudiar el comportamiento poscosecha de los frutos de la variedad *Victoria*, cuando son sometidas a diferentes tratamientos tales como acondicionamiento térmico, curado en agua a diferentes temperaturas, aplicación de cloruro cálcico, aplicación de difenilamina y plastificado (retractilado o sellado) y conservados a una temperatura de 4°C.

Como objetivos específicos de este trabajo:

1. Analizar los efectos de los diferentes tratamientos poscosecha sobre la firmeza, el contenido en clorofilas y la pérdida de peso en frutos conservados a 4°C durante 7 y 14 días.
2. Evaluar los efectos de los diferentes tratamientos poscosecha sobre la gravedad de los daños frío en los frutos de la variedad estudiada.
3. Cuantificar y estudiar la evolución de la tasa respiratoria (CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) y de la emisión de etileno de los frutos conservados a 4°C durante 7 y 14 días.
4. Cuantificar y estudiar la actividad enzimática oxidativa a nivel celular de los frutos conservados a 4°C durante 7 y 14 días.
5. Estudiar la relación entre los parámetros estudiados y las mermas de calidad producidas durante la conservación poscosecha a 4°C.
6. Proponer el/los tratamientos que se pueden aplicar en calabacín para reducir la pérdida de calidad en poscosecha.

# 2 | **Revisión Bibliográfica**

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Origen del calabacín

La mayoría de los estudios sitúa el origen de *Cucurbita pepo* L. en el centro y sur del continente americano, introduciéndose en Europa a principios del siglo XVI. Esta idea está apoyada por hallazgos arqueológicos que ponen de manifiesto la domesticación de *C. pepo* hace más de 4.000 años en tres sitios bastante alejados de Norte América, concretamente en el sureste y noroeste de México, y en el este de Estados Unidos (Paris, 2001), teniendo como posibles progenitores a *Cucurbita fraterna* en México y a *Cucurbita texana* en Estados Unidos (Hernández-Bermejo y León, 1994). Los datos de estudios aloenzimáticos (Decker, 1988) y estudios filogenéticos con ADN mitocondrial (Sanjur *et al.*, 2002) y marcadores RAPDs, AFLPs, ISSR y SSR han puesto de manifiesto que la domesticación y el origen de la subespecie a la que pertenece el calabacín, se produjo a partir de un progenitor desconocido hace unos 10.000 años en México.

El calabacín es la subespecie más reciente de *C. pepo*, de hecho, la primera descripción de la morfología del calabacín actual la realizó Tamaro en 1901 (Paris, 2001). Las variedades de calabacín que se cultivan actualmente son híbridos mejorados en América durante los últimos 50 años, obtenidos a partir de variedades italianas.

### 2.2 Taxonomía del calabacín

*Cucurbita pepo* L. es la especie a la que pertenecen las diferentes variedades actuales de calabacín. Pertenece a la familia *Cucurbitaceae* y género *Cucurbita*, que comprende dos subespecies: *ovífera*, que se emplea como ornamental, y *pepo* (también conocida como *condensa* u *oblonga*), a la que pertenece el calabacín (Paris 1989, 2001).

| Clasificación Taxonómica |                       |
|--------------------------|-----------------------|
| Clase                    | <i>Dicotiledonea</i>  |
| Subclase                 | <i>Metaclamideae</i>  |
| Orden                    | <i>Cucurbitales</i>   |
| Familia                  | <i>Cucurbitaceae</i>  |
| Género                   | <i>Cucurbita</i>      |
| Especie                  | <i>Cucurbita pepo</i> |
| Subespecie               | <i>Pepo</i>           |

**Tabla 2.1. Clasificación Taxonómica. Elaboración propia.**

Según la clasificación de Paris (1989, 2001), existen 8 morfotipos o variedades botánicas cultivadas, pertenecientes a las dos subespecies:

*Morfotipos de la subespecie pepo:*

- *Cocozelle*. Sus frutos son largos y bulbosos en la parte terminal, con un ratio longitud/anchura superior a 3,5.
- *Pumpkin*. Desarrolla frutos que van desde formas esféricas a ovals, con terminaciones redondas o estrechas, a veces presentan acanaladuras, estrías o verrugas y que pueden alcanzar los 25 kg de peso. A este morfotipo pertenecen las calabazas.
- *Vegetable Marrow*. Es muy común en el Oriente Medio y en el Norte de África. Sus frutos poseen corteza lignificada, son alargados pero ensanchados en la parte distal, con un ratio longitud/anchura entre 2 y 3.
- *Zucchini*. A este morfotipo pertenece el calabacín. Actualmente es el más importante económicamente y está extendido por todo el mundo. Son cilíndricos y alargados, teniendo un ratio longitud/anchura superior a 3,5.

*Morfotipos de la subespecie ovífera:*

- *Acorn*. Está compuesto por frutos que van desde formas ovales a cónicas y con diez ranuras profundas. Generalmente los frutos son de color verde.
- *Crookneck*. Los frutos son elongados, largos, delgados y con el “cuello” curvado y son normalmente amarillos y verrugosos.
- *Scallop*. Son aplanados, lignificados y generalmente discoidales y con bordes ondulados.
- *Straightneck*. Tiene frutos cilíndricos, amarillentos, verrugosos y anchos en su parte distal, además tienen un pedúnculo corto y estrecho en el extremo peduncular.

### **2.3 Morfología y características del fruto**

El fruto es una baya carnosa, unilocular, voluminosa, cilíndrica, sin cavidad central, a veces mazuda, y alargada (pepónide), procedente de un ovario ínfero, tricarpelar, trilocular y sincárpico. Son generalmente de color verde, siendo consecuencia el color de la interacción de pares de alelomorfos que determinan la intensidad del color y que éste sea uniforme, rayado, manchado, reticulado, punteado, etc. (Reche, 1997).

Los frutos nacen de las axilas de las hojas, estando unidos al tallo por un pedúnculo grueso y corto, de sección pentagonal. Se recolectan cuando aproximadamente se encuentra a la mitad de su desarrollo y antes de que se endurezcan (Reche, 1997).

En el fruto en pepónide del calabacín, las placentas están muy desarrolladas, llegando hasta la pared carpelar y rellenando todo el hueco del ovario, por lo que no existe cavidad en el mismo. La pared externa del exocarpo suele endurecerse en mayor o menor grado pudiendo hacerse leñosa (García-Breijo, 2009) al alcanzar la madurez fisiológica.



**Figura 2.1. Detalle de sección de un fruto de calabacín.**

Es un fruto no climatérico, lo que significa que la maduración no está regulada prioritariamente por el etileno (Abeles *et al.*, 1992). Si bien todos los frutos al igual que cualquier órgano vegetal producen etileno, sólo los frutos climatéricos incrementan notablemente la producción de etileno durante la maduración, mientras que los no climatéricos prácticamente mantienen la tasa de producción de etileno casi invariable.

Una de las características de los frutos no climatéricos, es que ante la aplicación de etileno, se comportan de la siguiente manera (Knee, 2002):

- No adelantan el climaterio respiratorio.
- En ausencia de daños fisiológicos o patológicos no hay producción autocatalítica de etileno, ni si quiera después de un tratamiento con etileno.
- La magnitud de la tasa respiratoria se incrementa ante dosis crecientes de etileno aplicado.

- Desde el punto de vista de la maduración organoléptica no hay respuesta ante el tratamiento con etileno, excepto en términos de desverdización (degradación de clorofilas).

Como fruto no climatérico, el patrón de crecimiento del fruto está caracterizado por una fase inicial lineal de tipo logarítmico, seguida de una disminución en el índice de crecimiento de forma gradual. (Wien, 1997).

## **2.4 Recolección y comercialización del calabacín**

La recolección del fruto es una operación de especial importancia, ya que de ella dependerá directamente que se obtengan mejores o peores resultados en la poscosecha. La manipulación de los frutos, una vez recolectados, debe ser muy cuidadosa, puesto que la piel de muchos frutos como el calabacín, es muy sensible a todo tipo de magulladuras.

Una vez seleccionados y clasificados de forma somera los productos en la explotación, eliminando los frutos enfermos, los frutos maduros y los defectuosos, son enviados a los mercados en origen o a las agrupaciones de agricultores, donde lleva a cabo la normalización del producto: limpieza, calibrado, clasificado, envasado y etiquetado, de acuerdo con el destino de dicha mercancía (mercado interior o exportación).

Para que los frutos puedan ser comercializados, deben cumplir una serie de parámetros mínimos exigidos que se encuentran regulados por normativas específicas para cada producto.

### **2.4.1 Normas de calidad para el calabacín**

De acuerdo con lo establecido por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía en el artículo 10.2 del Decreto 402/2008, de 8 de julio, por el que se regulan de mercados agrarios en zonas de producción y su registro, se



determinan los mínimos de calidad que deben reunir los productos hortofrutícolas, en los centros de recepción y antes de ser expuestos para la venta, puestos en venta, vendidos, entregados o comercializados de cualquier otra forma por el productor. Así, el Anexo II referente a calabacín dice lo siguiente:

I. Ámbito de aplicación.

Los presentes requisitos se refieren a los calabacines, de variedades (cultivares) obtenidas de *Cucurbita pepo* L. que cosechándose jóvenes y tiernos, antes que su semilla adquieran firmeza, se destinen a ser entregados al consumidor en estado fresco, con exclusión de los calabacines destinados a la transformación industrial.

II. Características de calidad.

A) Requisitos mínimos:

En todas las clases, teniendo en cuenta las disposiciones especiales de cada una de ellas y de los de los límites de tolerancias establecidos, los calabacines deben ser:

- Enteros y provistos de un pedúnculo que puede estar ligeramente dañado.
- De aspecto fresco.
- Sanos: se excluyen los productos afectados de podredumbre o de alteraciones tales que los hagan no aptos para el consumo.
- Prácticamente exentos de daños causados por insectos u otros parásitos.
- Prácticamente exentos de parásitos.
- Limpios, prácticamente exentos de materias extrañas visibles.
- Exentos de humedad exterior anormal.
- Exentos de olor y/o sabor extraño.

Además, los frutos deben ser:

- Firmes.
- Exentos de cavidades.
- Exentos de grietas.
- En un estado de desarrollo suficiente, antes de que sus semillas hayan adquirido firmeza. Los calabacines deben presentar un desarrollo y un estado tales que les permitan: Conservarse bien durante el transporte y la manipulación y llegar en condiciones satisfactorias al lugar de destino.

B) Clases comerciales.

Los calabacines se clasifican en dos clases, que se definen a continuación:

#### *Clase I*

Los calabacines clasificados en esta clase deben ser de buena calidad y presentar las características del tipo varietal o tipo comercial al que pertenezcan y deben estar provistos de un pedúnculo de longitud no superior a 3 cm. No obstante, siempre que no vean afectados su aspecto general ni su calidad, conservación, ni presentación del producto, estos calabacines podrán tener los defectos leves siguientes:

- Ligeros defectos de forma.
- Ligeros defectos de coloración.
- Ligeros defectos epidérmicos cicatrizados.
- Muy ligeros defectos debidos a enfermedades siempre y cuando no sean evolutivos ni afecten a la carne.

### *Clase II*

Esta clase comprende los calabacines que no puedan clasificarse en la clase I, pero que correspondan a los requisitos mínimos de las características de calidad precedentemente definidos. Siempre que conserven sus características esenciales de calidad y presentación, se pueden admitir.

- Defectos de forma.
- Defectos de coloración.
- Ligeras quemaduras de sol.
- Defectos epidérmicos cicatrizados, siempre que no resulten perjudiciales para la conservación.

Ligeros defectos debidos a enfermedades siempre y cuando no sean evolutivos ni afecten a la carne.

C) Tolerancias de calidad.

### *Clase I*

Un 10% en número o en peso de calabacines que no correspondan a las características de la clase, pero que se ajusten a las de la clase II o excepcionalmente admitidos en las tolerancias de dicha clase.

### *Clase II*

Un 10% en número o en peso de calabacines que no correspondan a las características de la clase ni a los requisitos mínimos de las características de calidad, con excepción de los productos afectados de podredumbre, de magulladuras pronunciadas, de heridas sin cicatrizar o de cualquier otra alteración que los haga no aptos para el consumo.

### III. Características de calibrado.

Estos requisitos de calibrado serán aplicables a todos los calabacines a excepción del mini calabacín, el tipo Marrow, y el redondo.

#### 1. El calibre se determinará por longitud o peso.

a) Por la longitud: En caso de calibrado por la longitud el mínimo establecido es de 7 cm y el máximo de 35 cm, ésta se medirá entre el punto de unión con el pedúnculo y el extremo de la corola del fruto, con arreglo a la escala siguiente:

- 7 cm a exclusive a 25 cm inclusive.
- 25 cm exclusive a 35 cm.

b) Por el peso: En caso de calibrado por el peso el mínimo establecido es de 50 g y el máximo es de 450 g, se respetará la escala siguiente:

- Desde 50 g exclusive a 225 g inclusive.
- Desde 225 g exclusive a 450 g.

El respeto a esta escala es obligatorio para la Clase I. El calibrado no será obligatorio para los productos de la Clase II, que sólo deberán respetar la longitud y el peso mínimo y máximo establecido en los apartados a) y b) anteriores.

#### 2. Tolerancias de calibre.

Clases I y II: Un 10% en número o en peso de calabacines que correspondan al calibre inmediatamente inferior o superior al que se mencione en el envase. No obstante, esta tolerancia sólo será aplicable a productos cuyas dimensiones o peso difieran como máximo un 10% de los límites fijados.

### IV. Características de presentación.

#### A) Homogeneidad.

El contenido de cada envase debe ser homogéneo y comprender calabacines del mismo origen, calidad y calibre (en la medida en que, en lo que se refiere a este último criterio, se exija un calibrado) y apreciablemente del mismo estado de desarrollo y de coloración.

#### B) Acondicionamiento.

El producto se colocará dentro del envase de forma que no sufra golpes, que no sobresalga de la altura de la caja (no se permitirán los colmados) y así mismo, el producto estará colocado en la caja de forma homogénea. La parte visible del contenido del envase debe ser representativa del conjunto.

#### C) Identificación.

En los centros de recepción o lugares de venta al por mayor y antes de ser expuestos para la venta, puestos en venta, vendidos, entregados o comercializados de cualquier otra forma por el productor, se identificarán:

Cada uno de los envases, de manera que puedan establecerse la trazabilidad del producto (código de identificación de la unidad homogénea de cultivo). No será necesario identificar los envases, pero si las partidas, cuando tengan como destino el centro de manipulado propio.

Las partidas, se identificarán con la información siguiente del producto:

1. Producto.
2. Tipo comercial y en su caso variedad.
3. Clase.
4. Calibre en su caso/sin calibrar.
5. Código trazabilidad (Unidad de tratamiento de cultivo homogéneo).
6. Origen (País y, en su caso, zona de producción, denominación regional o local).

## **2.5 Tecnología poscosecha**

Los productos hortícolas sufren pérdidas cualitativas y cuantitativas durante el periodo que va desde la recolección hasta el consumo. El porcentaje de pérdidas para los frutos frescos está estimado entre el 5 y el 25% en países desarrollados y el 20 al 50% en países en vías de desarrollo, dependiendo del producto (Kader, 1992). Es posible reducir estas pérdidas aplicando en conocimiento de los factores que influyen en el deterioro y utilizando técnicas que retrasen la senescencia de los frutos y mantengan la calidad.

El objetivo principal de las tecnologías de conservación poscosecha es retardar la maduración y senescencia, con el fin de prolongar la vida comercial de los productos y conservar su calidad.

### **2.5.1 Almacenamiento de los frutos en refrigeración**

Con el almacenamiento en refrigeración de los frutos se pretende disminuir la velocidad a la que el fruto se deteriora, manteniendo así el producto durante periodos tan largos como sea posible en las condiciones adecuadas para el consumo, sin acarrear una maduración anómala u otros cambios perjudiciales.

La refrigeración es una de las tecnologías más empleadas para la conservación de frutas y hortalizas. Su amplia utilización se debe a que permite conservar el valor nutritivo, sabor natural, olor y calidad de los productos almacenados resultando éstos semejantes a los recién cosechados. Además, esta práctica de conservación permite, en muchos casos un mayor margen de tiempo para su transporte. La baja temperatura puede disminuir sustancialmente la velocidad de muchos procesos metabólicos (respiración, fotosíntesis, producción de etileno, maduración, senescencia, etc.), además de proteger al fruto del ataque de patógenos que conducen al deterioro y a la pérdida de la calidad (Kitinoja y Kader, 2003). Sin embargo, el efecto del frío persiste solo mientras el alimento se mantiene a la temperatura de refrigeración. Por lo tanto, será estrictamente necesario que exista lo que se llama cadena de frío para conseguir que el producto se mantenga a

la temperatura establecida desde que sale de la línea de producción hasta el momento anterior al consumo. La cadena de frío debe comenzar inmediatamente después de que el producto haya sido refrigerado o congelado y su primer eslabón estará constituido por el almacenamiento, a la temperatura adecuada, en la misma instalación de origen. A partir de este momento, la cadena de frío debe encargarse de que el producto se mantenga a la temperatura correspondiente en todo momento (Rubio, 2010).

No existe una temperatura ideal para el almacenamiento de todas las frutas y hortalizas, dado que son distintas sus respuestas a las bajas temperaturas. La temperatura adecuada para cada especie y variedad se establece tomando en cuenta tanto factores climáticos y labores culturales durante el desarrollo, como el crecimiento de hongos, la susceptibilidad al daño por frío, así como la duración del periodo de conservación deseado durante el almacenamiento (Kitinoja y Kader, 2003).

A pesar de todas las ventajas que supone el uso de la refrigeración, para ciertos productos, sobre todo los de origen tropical y subtropical, este tipo de práctica de conservación presenta algunos problemas, debido a la susceptibilidad que presentan estos productos a las bajas temperaturas.

#### **2.5.1.1 Daños por frío**

Los productos hortofrutícola de origen tropical o subtropical, resultan en mayor o menor grado, sensibles a las bajas temperaturas y presentan daños cuando son sometidos a temperaturas bajas superiores al punto de congelación de los tejidos, sufriendo un estrés por frío. (Osorio-Mora y Zacarías, 2000; Balandrán-Quintana *et al.*, 2003). La sensibilidad a las bajas temperaturas que caracteriza a estos productos puede derivar en una fisiopatía compleja conocida como daño por frío (DF). La gravedad del daño está relacionada con la especie, el cultivar de que se trate, las condiciones precosecha y poscosecha, las temperaturas, y los períodos de almacenamiento, entre otros factores. Hay ensayos que mostraron diferencias en

cuanto a la gravedad y cantidad de DF entre diferentes variedades de calabacín conservados en las mismas condiciones (Carvajal *et al.*, 2011; Megías *et al.*, 2014).

Son muchas las disfunciones celulares y las alteraciones fisiológicas y bioquímicas que induce el frío moderado (no congelante) de manera directa: generalmente estimula la tasa respiratoria y la emisión de etileno, reduce la fotosíntesis, aumenta la permeabilidad de la membrana al afectar a la estructura y composición de dichas membranas vegetales, aumentando la viscosidad de la matriz lipídica y la rigidez de las membranas, que adquieren una estructura gel-cristalina. Los cambios en la temperatura del medio afectan también al funcionamiento de las enzimas y de los transportadores incluidos en la matriz lipídica de las membranas, y con esto a los intercambios a través de ella, lo que altera la permeabilidad y perturba las funciones celulares, que en los casos más graves, produce un trasvase de electrolitos y metabolitos entre los diversos compartimentos celulares y entre las células y el medio, llegando incluso a la ruptura de las membranas, necrosis y muerte del órgano o de la planta (Mazliak, 1992 citado en Artés y Artés-Hernández, 2003). En pepinos sometidos a frío, se ha visto que ocurren cambios en la composición de los polisacáridos (Gross y Wang, 1984 citados en Carvajal *et al.*, 2011) de las paredes celulares, y en calabacín se produjo un aumento en la actividad de la enzima hidrolítica poligalacturonasa en frutos almacenados a 5°C después de 9 días, en comparación con frutos almacenados a 12°C (Balandrán-Quintana *et al.*, 2007 citados en Carvajal *et al.*, 2011).

El frío moderado también puede tener una acción más gradual y duradera, que conduce a una alteración primaria e indirecta del metabolismo, e incluso a un desequilibrio hídrico, que da lugar a una alteración secundaria que puede tener consecuencias reparables, dependiendo del estado fisiológico del fruto (Levitt, 1980). En efecto, hay estudios en tomate *Daniela* en los que los frutos pintones fueron menos sensibles a los DF que los verdes (Artés, 1999) o en pimiento *Lamuyo* donde los frutos rojos no presentaron síntomas a 2°C, mientras que los verdes fueron muy sensibles (Serrano *et al.*, 1997). Por lo que se puede suponer que frutos inmaduros fisiológicamente, como en el caso del calabacín, serán más sensibles a DF que frutos maduros.



La temperatura crítica a la que aparecen los DF, varía de un órgano a otro o de una especie a otra, y puede ser de -0,5° a 4°C para los poco sensibles, de 4 a 7°C para algunas especies de clima templado, y desde unos 8 hasta 15°C (incluso 20°C) para las tropicales y subtropicales más sensibles. Por ello, los órganos vegetales se consideran resistentes al frío cuando pueden almacenarse sin alteraciones a temperaturas próximas al punto de congelación, moderadamente sensibles si se alteran entre 2 y 7°C, y muy sensibles, cuando no soportan temperaturas por debajo de 15 a 20°C (Artés, 2003).

Las plantas activan en respuesta a cambios en las membranas producidos por frío, la liberación de una serie de mensajeros como el inositol-trisfosfato y diacilglicerol que contribuyen a un incremento de los niveles de calcio citoplásmico por entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  desde el apoplasto o liberado de fuentes intracelulares (Alexandre *et al.*, 1990; Knight *et al.*, 1996). Estos cambios del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico actúan sobre factores de transcripción provocando cambios que afectan a la expresión de la mayoría de genes de respuesta a estrés que finalmente dirigen la respuesta fisiológica que les ayudan a minimizar los efectos negativos del estrés por bajas temperaturas.

Algunas de las reacciones inducidas por esta respuesta implican cambios en el contenido de proteínas constitutivas o la síntesis de *nov*o de péptidos y proteínas asociadas a la situación de estrés, entre ellas se hallan enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, en la modificación de los lípidos de membrana o en la defensa antioxidante (Renaut *et al.*, 2006, citado por Royo, 2010), proteínas anticongelantes, proteínas crioprotectoras como dehidrinas (Rorat, 2006, citado por Royo, 2010) o proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs). Diferentes estudios han demostrado el papel protector de distintas PRs, principalmente quitinasas, 1,3- $\beta$ -glucanasas y taumatina, en la aclimatación al frío presentando actividad anticongelante y/o crioprotectora (Hincha *et al.*, 1997; Griffith y Yaish, 2004; Romero *et al.*, 2008; citados por Royo, 2010).

### 2.5.1.2 Síntomas de los Daños por frío

El desarrollo síntomas de los DF, se sabe que tiene lugar en dos fases sucesivas:

- *Primera fase:* tiene una duración que depende del material vegetal y se denomina fase umbral de inducción o fase de latencia, en la que las alteraciones son tan poco severas que no se manifiestan los síntomas. En esta fase los productos pueden retornar a un estado normal cuando simplemente cesa el frío moderado (Marcellin, 1992; Artés, 1995).
- *Segunda fase:* cuando se supera la fase anterior de inducción, aparecen los síntomas, y su establecimiento es irreversible. La elevación moderada de la temperatura solo contribuye a acelerar su desarrollo (Marcellin, 1992; Artés, 1995).

Los principales síntomas del daño por frío que aparecen en productos hortícolas almacenados a baja temperatura incluyen la formación de pequeñas depresiones circulares o de formas irregulares en la piel debidas al colapso de las células del parénquima localizadas varias capas por debajo de la epidermis, lo que se conoce como *pitting* y afecta a la mayoría de frutos tropicales y subtropicales, que generalmente va seguida de un debilitamiento de la resistencia a daños mecánicos y susceptibilidad a las infecciones fúngicas. Además se produce infiltración de agua en los espacios intercelulares, cambios en la textura de los frutos, fallos en la maduración, necrosis de las semillas y aumento de la emisión de CO<sub>2</sub> y C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (Salveit y Morris, 1990).

El ablandamiento de un fruto puede estar asociado principalmente a una hidrólisis enzimática de los polisacáridos de la pared celular, especialmente de la pectina. Asociado a este problema se produce un incremento de las actividades hidrolíticas de las enzimas poligalacturonasas y pectinmetilesterasas (Karakurt y Huber, 2003), ambas enzimas relacionadas con la degradación de la pectina durante maduración de frutos. Junto a estas dos enzimas, existen trabajos que relacionan un aumento de la expresión de expansinas con el incremento del ablandamiento del

fruto (Kalamaki *et al.*, 2003), mientras que la supresión de la actividad expansiva es capaz de disminuir la despolimerización de la pectina (Kalamaky *et al.*, 2003). En sandía y pepino, dos cucurbitáceas no climatéricas como el calabacín, el ablandamiento del fruto también se ha relacionado con un aumento en la concentración de etileno durante su conservación (Karakurt y Huber, 2003).

También se producen pardeamientos internos o superficiales, producto de la reacción entre compuestos de la vacuola y del citoplasma (Corbineau y Côme, 1994).



**Figura 2.2. Daños por frío en calabacín.**

### **2.5.2 Factores que intervienen en la senescencia de los frutos en poscosecha**

Los frutos, y en general los productos hortícolas de consumo, son tejidos vivos que experimentan continuos cambios después de la cosecha, siendo la senescencia el estado final del desarrollo, durante el cual tienen lugar una serie de procesos irreversibles que conducen a la muerte de las células (Capellini *et al.*, 1998).

### 2.5.2.1 Producción de etileno

Como hormona vegetal, el etileno ( $C_2H_4$ ) regula diversos aspectos del desarrollo, crecimiento y senescencia, siendo fisiológicamente activo en cantidades menores a 1 ppm. Es la única hormona que se encuentra en forma gaseosa, lo que le confiere la capacidad de difundirse rápidamente por los espacios intercelulares y coordinar una respuesta rápida y uniforme en los tejidos.

El etileno puede ser producido por todas las partes de las plantas superiores, aunque la tasa de producción depende del tejido y del estado de desarrollo. En general, las regiones meristemáticas y las regiones nodales son las más activas en la biosíntesis del etileno. Sin embargo, la producción del etileno aumenta durante la abscisión de la hoja y la senescencia floral, así como durante la maduración del fruto (Azcón-Bieto y Talón, 1993). La biosíntesis del etileno también varía de modo circadiano, con un máximo durante el día y alcanzando el mínimo durante la noche.

La metionina es el precursor del etileno. A través de metionina y ATP se sintetiza S-adenosilmetionina (SAM), que se transforma en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por acción de la ACC sintetasa, y éste en etileno por la acción de la ACC oxidasa. Es un proceso complejo con numerosas reacciones en el que se requiere  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $Fe^{2+}$  y luz, que actúan como factores limitantes, lo que es aprovechado para la conservación en atmósferas modificadas. Se sabe que el mismo etileno es capaz de regular su propia biosíntesis (autocatálisis). El etileno actúa como precursor en la producción de reguladores de crecimiento y diversas sustancias implicadas en la maduración y senescencia de los órganos (Lafuente y Zacarías, 2006).

Aunque en los frutos no climatéricos como el calabacín hay una relación clara entre la producción de etileno y la duración de su vida comercial, se sabe que la exposición de muchos de ellos a etileno acelera su senescencia. Generalmente, la producción de etileno aumenta con el periodo de almacenamiento, heridas físicas, incidencias de enfermedades, temperaturas superiores a  $30^{\circ}C$  y estrés hídrico. Por otro lado, la producción de esta hormona se reduce con el almacenamiento a bajas

temperaturas, reducción del oxígeno por debajo del 8% y elevación del CO<sub>2</sub> a más del 2%, niveles variables según el tipo de fruto (Kader, 1992).

La exposición a temperaturas bajas en calabacín, da lugar inmediatamente a la producción de etileno al pasar de nuevo a temperaturas más calientes, siempre y cuando la exposición a las bajas temperaturas no excedan un cierto periodo de tiempo que causaría un daño irreparable a la biosíntesis de etileno y al funcionamiento normal de las células (Field, 1990 citado en Balandrán-Quintana *et al.*, 2003).

En efecto, ensayos realizados en diferentes cultivares de calabacín almacenados en poscosecha, se vio que la producción de etileno fue baja a 4°C, pero fue inducida rápidamente después de la transferencia a 20°C durante un mínimo de 4 h (Megías *et al.*, 2012). En ese mismo ensayo también se observó que el etileno no es necesario para la activación de los síntomas de daños por frío en calabacín, sin embargo, el nivel de etileno fue menor en los cultivares que eran más tolerantes a la DF, y fue menor también en tratamientos de acondicionamiento de temperatura que alivian los síntomas de DF. De hecho, en ensayos realizados por Megías *et al.* (2013), en calabacines tratados con 1-metilciclopropeno (1-MCP), un potente inhibidor de la acción del etileno, y almacenados en frío durante 14 días, se observó que el etileno tiene un papel activo en el proceso de desarrollo de los DF en calabacín.

El uso de de compuestos que actúan como competidores por el sitio de unión al receptor, como el ion Ag<sup>+</sup> y el CO<sub>2</sub> (a concentraciones altas), y algunas olefinas como el 1-metil-ciclopropeno, que se unen al receptor del etileno de forma casi irreversible, hacen que puedan tener una especial importancia comercial como inhibidores de la producción de etileno (Massolo *et al.*, 2012).

### 2.5.2.2 Respiración

La respiración es un proceso por el cual los compuestos orgánicos (carbohidratos, proteínas, grasa) son transformados en productos finales con la liberación de energía. En este proceso se consume oxígeno y se desprende CO<sub>2</sub>. La pérdida de las reservas energéticas de los frutos durante la respiración significa:

- La llegada de la senescencia cuando las reservas que suministran energía se agotan.
- Reducción del valor energético para el consumidor.
- Pérdida de peso seco (importante en productos que le afecte especialmente la deshidratación, como frutos inmaduros fisiológicamente). El calor liberado por los frutos, conocido como calor vital, afecta a la tecnología de poscosecha en lo referente a estimaciones de los requerimientos de refrigeración y ventilación.

La tasa de deterioro de los productos cosechados es generalmente proporcional a la tasa respiratoria. En general, cuanto mayor es el ritmo respiratorio del producto, menor es su vida útil de almacenamiento. El corte de un tejido vegetal provoca una aceleración en la respiración, así como los daños mecánicos, llegando el producto cortado a duplicar y hasta cuadruplicar la intensidad respiratoria con respecto al producto fresco como respuesta al estrés del corte (Sánchez, 2003).

Se ha comprobado que bajos niveles de O<sub>2</sub> retardan la respiración y el metabolismo de carbohidratos, y los altos niveles de CO<sub>2</sub> (como los empleados en la atmósfera de almacenamiento) actúan eficientemente en retardar los mecanismos dependientes de la síntesis de etileno, como la degradación de la pared celular y los cambios de color, debido a la reducción de la respiración y la disminución de la actividad de algunas enzimas (Beaudry, 1999).

La concentración de CO<sub>2</sub> también puede tener un efecto positivo sobre la aparición de DF. Se ha observado que en tejidos pretratados con altas concentraciones de CO<sub>2</sub> incrementan los niveles de glicina-betaína, amina

cuaternaria con función osmoprotectora y crioprotectora, durante el periodo de conservación a bajas temperaturas (Goñi *et al.*, 2012).

La respiración en los frutos depende de varios factores como son la especie, la variedad y el grado de maduración del fruto, así como también la temperatura y la composición de los gases del ambiente que rodea a la fruta.

Los frutos climatéricos muestran un fuerte aumento de la producción de CO<sub>2</sub>, los cuales coinciden con el proceso de maduración comercial, mientras que los no climatéricos no muestran estos cambios y, generalmente producen bajas cantidades de CO<sub>2</sub> durante la maduración comercial (Salisbury y Ros, 1992, citado por Goñi, 2012).

### **2.5.2.3 Transpiración**

Un fruto cosechado pierde agua por transpiración de manera irreversible. Los frutos recolectados más tiernos se deshidratan más fácilmente, debido a que su piel está menos formada (Sois, 1980). Como consecuencia, el producto sufre una serie de alteraciones fisiológicas que aceleran los procesos de senescencia, síntesis de etileno y deterioro de tejidos. Esto, conjuntamente con los síntomas externos de marchitez y arrugamiento del producto (pérdida de firmeza), y pérdida de peso, afectan seriamente su calidad comercial (un 5% de pérdida de agua es aproximadamente el valor máximo permisible en frutas).

La pérdida de agua por transpiración depende de factores ambientales, siendo mayor a temperatura alta y humedad relativa baja, y de factores internos del fruto, como las características morfológicas y anatómicas, relación superficie-volumen, heridas superficiales, estado de madurez o variedad (Namesny, 1997).

La transpiración es un proceso físico que puede ser controlado por un tratamiento adecuado según el fruto (por ejemplo, con el mantenimiento de una alta humedad relativa, una temperatura baja y control de la circulación de aire) (Namesny, 1987).

#### 2.5.2.4 Cambios en la composición.

Durante el desarrollo y la maduración de los órganos de la planta, tienen lugar cambios de sus pigmentos y de sus otras sustancias (como carbohidratos, proteínas, etc.) que continúan después de su recolección. Los más importantes (Kader, 1992), son:

- La pérdida de clorofila. Las clorofilas son pigmentos liposolubles asociados a las membranas internas del cloroplasto. A lo largo de la maduración, las membranas tilacoidales se descomponen y las clorofilas se degradan. Así, los cloroplastos pierden progresivamente su morfología y sus funciones fotosintéticas. En este proceso se generan una serie de metabolitos no fluorescentes a través de intermediarios como la feoforbida a, que se transportan hasta la vacuola, donde se almacenan. Éste es el punto en el que se pierde el color verde asociado a las clorofilas a consecuencia de la obertura de su estructura en anillo, catalizada por la enzima oxigenasa de la feoforbida a (Schaffer *et al.*, 2007, citado por Viñas *et al.*, 2013).
- Desarrollo de carotenos (color amarillo y naranja). Los carotenoides son compuestos liposolubles de tipo isoprenoide. Su síntesis se regula hormonalmente por la expresión de algunos isogenes, y se requiere entre otras hormonas, etileno. Schaffer *et al.* (2007) (citado por Viñas *et al.*, 2013), observaron que los genes implicados en las primeras etapas de la biosíntesis de compuestos fenólicos (como los carotenos y antocianinas), responden a responden al etileno, mostrándose una alta tasa de expresión en respuesta a la aplicación de etileno. Los carotenoides además, actúan como antioxidantes, dada su capacidad para reaccionar con radicales libres, principalmente iones peróxido y superóxido, retrasando o inhibiendo la oxidación de lípidos.
- Desarrollo de antocianinas (color rojo y azul). Al igual que los carotenoides, actúan como antioxidantes, reaccionando con radicales peróxido y superóxido, y retrasando o inhibiendo la oxidación de lípidos.



- Conversión de almidón en azúcar.
- Conversión de azúcar en almidón.
- Conversión de almidón y azúcar en CO<sub>2</sub> y pérdida de agua en la respiración.

Cambios de las pectinas y otros polisacáridos conlleva un ablandamiento del fruto y, como consecuencia, un aumento de la susceptibilidad a daños mecánicos. Cambios en los ácidos orgánicos, proteínas, y aminoácidos y lípidos influyen en el sabor de los productos y la pérdida en el contenido de vitaminas, especialmente el ácido ascórbico (vitamina C) disminuye la calidad nutritiva. La producción de aromas volátiles asociados a la maduración es muy importante en la calidad en lo referente al sabor.

#### **2.5.2.5 Desordenes fisiológicos.**

La exposición de los frutos a temperaturas inadecuadas puede causar los siguientes desórdenes fisiológicos:

- *Congelación* cuando al fruto se le somete a temperaturas por debajo de su punto de congelación.
- *DF* en frutos tropicales y subtropicales a temperaturas superiores a su punto de congelación como se explicó en apartados anteriores.
- *Daños por calor* producidos por la exposición a temperaturas excesivamente altas. Según (Kader, 1992), el ritmo de deterioro del producto es 2 a 3 veces mayor por cada incremento de 10 °C por encima de su temperatura óptima de conservación. Los síntomas incluyen maduración desigual, excesivo ablandamiento y desecación.

La exposición de los frutos a determinadas concentraciones de gases también puede producir ciertos desordenes. Así, porcentajes muy bajos de oxígeno

(inferiores al 1%) pueden inducir procesos de fermentación en las frutas ocasionando la producción de malos olores y sabores y el deterioro del producto, y altos de CO<sub>2</sub> (mayores del 20%) atmosféricos pueden producir decoloración y deterioro internos, así como mal sabor y depresiones superficiales en la superficie (pitting). (Kader, 1992).

#### **2.5.2.6 Daños físicos**

Los daños mecánicos no son solo visibles, sino que además aceleran la pérdida de agua, proporcionan lugares para la invasión de hongos y estimulan la producción de CO<sub>2</sub> y etileno (Kader, 1992).

La rotura de los tejidos de la fruta ocasionada por daños físicos facilita la invasión por microorganismos e incrementa la pérdida de agua del producto. Ciertos patógenos producen o inducen la formación de enzimas que hidrolizan las paredes celulares, ocasionando un ablandamiento de los tejidos y una degradación de toda la fruta. Los tejidos de la fruta pueden decolorarse por la síntesis de ciertas sustancias que se producen como respuesta al ataque de los patógenos. Además, los patógenos pueden producir o inducir la síntesis de una serie de productos tóxicos que ocasionan malos olores y sabores que hacen que la fruta no sea apta para el consumo humano.

La susceptibilidad de las frutas al deterioro por enfermedades aumenta con el tiempo de almacenamiento. Esto está relacionado con el proceso de senescencia durante el cual se incrementa la permeabilidad de las membranas celulares y se produce una eventual desorganización total de la estructura del producto. Con la edad del producto también disminuye la capacidad de síntesis de sustancias fungistáticas naturales (fitoalexinas) que protegen a las frutas.

### **2.5.2.7 Desórdenes patológicos.**

Uno de los síntomas más comunes y obvios del deterioro, es el que resulta de la actividad de las bacterias y de los hongos. El inicio de la maduración en las frutas y la senescencia en todos los productos los hacen susceptibles a las infecciones de los patógenos.

El ataque de los organismos ocurre después del daño mecánico, físico o desorden fisiológico del fruto, ya que estos daños disminuyen la resistencia a los patógenos (Shewfelt, 1990), aunque en algunos casos los patógenos pueden infectar tejidos aparentemente sanos y ser la principal causa del deterioro (Kader, 1992).

### **2.5.3 Estrés oxidativo**

El metabolismo aerobio genera y consume de forma continuada y controlada una amplia variedad de especies activadas del oxígeno (EROS) como son: anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) o el oxígeno en estado singlete ( $^1O_2$ ) en el proceso de la respiración.

Las EROS reaccionan muy fácilmente con las macromoléculas biológicas más importantes; así, en contacto con los ácidos grasos poliinsaturados de los glicerolípidos de las membranas, lo que implica directamente una degradación de ésta, forman peróxidos y modifican los aminoácidos que componen las proteínas. También inducen la ruptura y agregación de las proteínas, haciéndolas más susceptibles al ataque de las proteasas y causan mutaciones y deleciones en los ácidos nucleicos.

Existe un equilibrio producción-eliminación de las EROS, el cual se ve alterado en las situaciones de estrés, provocando su acumulación e imponiendo condiciones de estrés oxidativo. La acumulación de EROS es indicativo de estrés oxidativo, y se asocia con el desarrollo de DF en frutos cosechados (Sevillano *et al.*, 2009).

Bajas temperaturas aumentan los niveles de EROS e inducen estrés oxidativo en plantas (Karpinski *et al.*, 2002), siendo estas moléculas las responsables de algunas de las alteraciones causadas en las plantas por efecto de las bajas temperaturas (Sevillano *et al.*, 2009).

Ante esta situación la planta u órgano de la planta estimula la síntesis de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, el ascorbato y el  $\alpha$ -tocoferol que actúan como antioxidantes o como sustratos de las reacciones de detoxificación, además de la síntesis de enzimas oxidantes como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa, la glutatión reductasa, la deshidroascorbato reductasa, la monodeshidroascorbato reductasa y la catalasa (Azcón-Bieto y Talón, 1993).

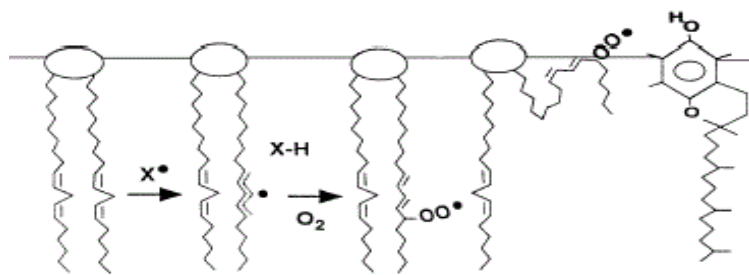
Existe una relación positiva entre los niveles de  $H_2O_2$  y los daños por frío, así como una relación negativa entre la actividad de la catalasa y los daños por frío, lo que hace de estos parámetros unos buenos indicadores del daño por frío (Carvajal *et al.*, 2011).

### **2.5.3.1 Lipoperoxidación**

El incremento en el estrés oxidativo a nivel celular ha cobrado gran importancia como uno de los eventos predominantes en la senescencia vegetal y en las respuestas de las plantas a distintos tipos de estrés (biótico o abiótico).

La lipoperoxidación es una consecuencia natural de los procesos metabólicos en la célula, que ocurre tanto en plantas como en animales. Involucra reacciones de iniciación, propagación y terminación, y la formación y propagación de radicales de lípidos, el consumo de oxígeno, un rearrreglo de los dobles enlaces de los lípidos insaturados y la destrucción de los lípidos de la membrana (Snaich, 1992; Mittler, 2002 citado por Rivera, 2005). La principal manifestación molecular de este incremento en el estrés oxidativo es la peroxidación de los lípidos de membrana, que se ha propuesto como punto de confluencia de varias fisiopatías y diversos tipos de estrés (Shewfelt y del Rosario, 2000; Elkahoui *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2005, citado por Rivera, 2005).

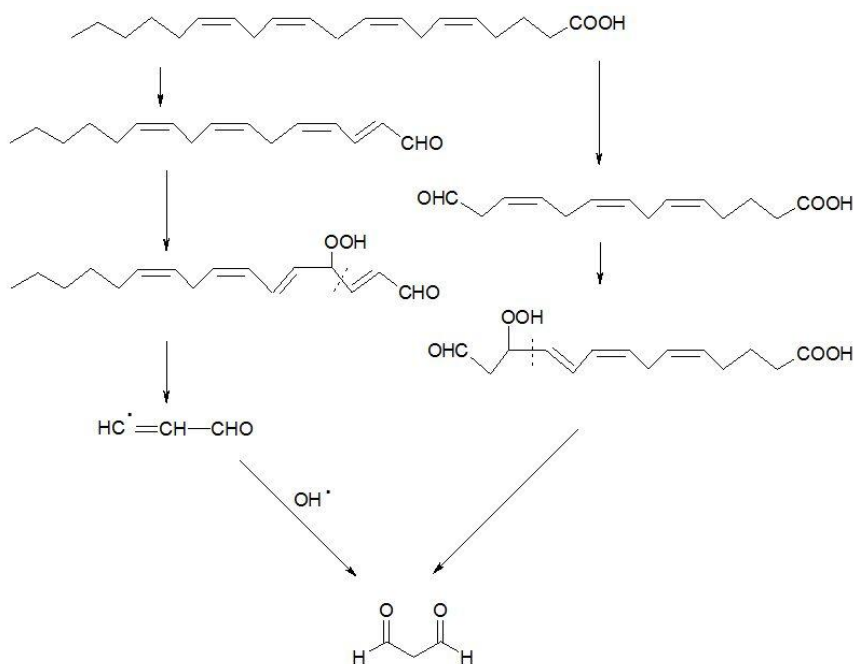
Todas las EROS son extremadamente reactivas y citotóxicas. El daño causado en la lipoperoxidación conduce a la pérdida de la compartimentación celular, fuga o pérdida del contenido celular, a una rápida desecación y a la muerte celular en casos extremos, y afecta a la función de las proteínas de membrana (Mittler, 2002). Además produce una gran variedad de productos de degradación, como alcoholes, cetonas, aldehídos y otros (Snaich, 1992; Mittler, 2002, citado por Rivera, 2005).



**Figura 2.3. Destrucción de los lípidos de la membrana celular por lipoperoxidación.**

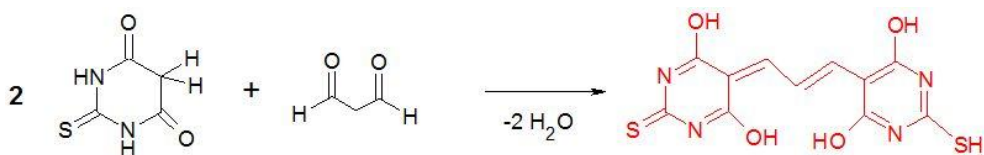
**Fuente: Blokhina (2000).**

El mecanismo de la lipoperoxidación según (Esterbauer, 1991 citado por Ilie y Margina, 2012) consiste en la sucesiva generación de peróxidos y  $\beta$ -escisión de la cadena lipídica de los lípidos de la membrana, con una reacción de acroleína radical con un resto hidroxilo, produciéndose malondialhído (MDA).



**Figura 2.4. Lipoperoxidación de un ácido graso y formación de MDA. Fuente: Esterbauer (1991).**

La medición o cuantificación del malondialhído (MDA), se ha usado como un indicador de la lipoperoxidación y ésta a su vez se ha usado como un parámetro indicador de estrés oxidativo en células y tejidos (Esterbauer *et al.*, 1991). El método más utilizado para cuantificar los productos de lipoperoxidación consiste en la condensación de MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA) que produce un complejo de color rojizo que se puede cuantificar mediante espectrofotometría (500-600 nm, dependiendo del procedimiento utilizado). (Ilie y Margina, 2012).



**Figura 2.5. Reacción con TBA para determinar el contenido en MDA. Fuente: Ilina y Margina (2012).**

## 2.5.4 Tratamientos en poscosecha

Puesto que una mala manipulación del producto durante la poscosecha puede acarrear pérdidas cuantiosas, la investigación en fisiología de la conservación poscosecha de las hortalizas está adquiriendo cada día más importancia. El incremento de la eficacia de las técnicas de conservación exige mayor conocimiento de la naturaleza y las causas de las pérdidas desde que se recolecta un fruto hasta que llega al consumidor. Por otro lado, una buena gestión poscosecha permite no sólo minimizar las pérdidas, sino también mejorar la valoración de los productos agrícolas comercializados, generando en ellos un valor añadido.

El papel fundamental de la tecnología en este campo es el de establecer procedimientos que restrinjan al máximo la alteración de las frutas y hortalizas durante su vida comercial, para lo que se han desarrollado numerosas técnicas y tratamientos.

### 2.5.4.1 Tratamientos térmicos

La justificación del uso de ciertos tratamientos térmicos para limitar los DF y otros síntomas de senescencia, como son el acondicionamiento térmico o curado no es generalizada, ya que depende mucho de la variedad y del estado fisiológico del fruto. Una posible explicación de los tratamientos térmicos reside en los efectos favorables para reducir las pérdidas de peso, en aumentar la resistencia a la difusión de gases no condensables a través de la epidermis de los frutos y en que puede lograr un cierto avance de la maduración de los frutos inmaduros, evitando el DF y con frecuencia, diversas podredumbres al facilitar la lignificación de los tejidos y evitar la proliferación de los microorganismos (Artés y Artés Hernández, 2003).

El acondicionamiento térmico del calabacín con 15°C durante 2 días reduce los daños por frío, debido a la supresión de la actividad de la peroxidasa (enzima que cataliza la oxidación) y reduciendo el descenso de la actividad de la catalasa (enzima que cataliza la conversión del oxidante peróxido de hidrógeno, en agua y oxígeno) (Wang, 1996). En calabacín, se encontró una mayor actividad de la

glutación reductasa (cataliza la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido, el cual actúa en la defensa antioxidante), en comparación con los calabacines que no se preacondicionaron (Wang, 1994, 1995 citados Wang, 1996). Esto sugiere que en calabacín el aumento en la resistencia a los daños por frío mediante el preacondicionamiento, está asociado con la protección en el deterioro de los lípidos de la membrana por un incremento en la actividad de la catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa, y el sistema antioxidante peroxidasa ascorbato (Wang, 1995; Zheng *et al.*, 2008 citados en Carvajal *et al.*, 2011). Las enzimas del ácido ascórbico reaccionan directamente reduciendo el superóxido de hidrógeno y radicales de hidrógeno (Foyer *et al.*, 1991 citados en Wang, 1996). Según (Wang, 1996), la actividad de estas enzimas permaneció más alta en calabacines tratados con el preacondicionamiento que en los calabacines no tratados, indicando que el aumento en la resistencia a los daños por frío por este preacondicionamiento térmico debe involucrar cambios en la actividad de las enzimas en el sistema antioxidante del ascorbato.

También se ha atribuido esta reducción de la sensibilidad a los daños por frío, no sólo a la presencia de proteínas de choque térmico (HSP) que se producen como consecuencia de un estrés, sino que ya que estos daños están asociados al daño a la membrana (Lyons, 1973 citado en Lurie, 1998), el tratamiento con calor seguramente cause daño a la membrana. Las altas temperaturas de entre 35-45°C aumentan el flujo por la membrana (Inaba y Chachin, 1988; Lurie y Klein, 1991 citados en Lurie, 1998), pero después de ser retirados del estrés provocado por el calor, los tejidos se recuperan y el flujo a través de la misma recupera los valores que tenía antes de ser aplicado el calor a unos 20°C (Lurie y Klein, 1990 citados en Lurie, 1998). En definitiva, se produce un cambio en los lípidos de membrana que significa una adaptación de los tejidos que hace que los mismos soporten mejor las bajas temperaturas (Lurie *et al.*, 1997 citados en Lurie, 1998).

Un estrés por calor, puede acondicionar a las plantas a las bajas temperaturas. Cuando un tratamiento por calor durante 2-3 días a 38°C mediante aire se aplicaba a frutos de tomate, su sensibilidad a las bajas temperaturas disminuía y podían permanecer almacenados durante más de 1 mes a 2°C sin



desarrollar daños por frío (Lurie y Klein, 1991; Sabehat *et al.*, 1996; Lurie y Sabehat, 1997 citados en Lurie, 1998). Esta respuesta se ha encontrado también en muchos otros cultivos como el aguacate, cítricos, pepino, mango, pimientos y en calabacín (Wang, 1994 citado en Lurie, 1998).

El curado en aire a 35°C y 95% HR durante 3 días en mandarina *Fortune* sensible a temperatura inferior a 9°C, inhibió los DF durante 8 semanas a 5°C y 90% HR (Martínez *et al.* 1994). Un curado de 3 días en aire a 33°C y 95% HR antes del almacenamiento de granada *Mollar* controló el picado y la escaldadura superficial durante 3 meses a 2°C (Artés *et al.*, 2000).

El curado en agua caliente a 53°C durante 2 minutos en naranja *Navelate*, seguido de siete semanas a 2°C y 90% HR y una semana a 20°C previno los DF (1,3%) frente al 34,5% en el testigo (Artés *et al.*, 1998), así como la refrigeración por etapas de 3 o 4°C en banana, aguacate y tomate, disminuyó los DF (Marcellin y Ulrich, 1983, citado por Artés, 2003).

Una técnica que también ha dado resultados favorables es el calentamiento intermitente (CI). Consiste en someter a los frutos a elevaciones periódicas de la temperatura en el curso de la refrigeración frigorífica convencional, de duración e intensidad variable según el producto. Este tratamiento se ha considerado el más eficaz para minimizar los DF en los órganos vegetales (Marcellin, 1992), probablemente por su capacidad para restaurar la alteración de las membranas celulares, eliminar posibles metabolitos tóxicos acumulados en las células y tejidos a baja temperatura, o incluso favorecer la síntesis de algún metabolito indispensable para la célula (Marcellin y Ulrich, 1983; Artés, 1995b citado por Artés, 2003).

En limón *Fino* el calentamiento intermitente durante 2 semanas a 13°C cada 2 semanas a 2°C, durante 2 meses de almacenamiento controló eficazmente los DF (Artés *et al.*, 1993). La combinación de un CI de 4 ciclos de 1 día a 20°C cada 6 días a 0°C y envasado en película perforada en melocotón, también redujo la textura esponjosa y la descomposición interna (Fernández-Trujillo y Artés, 1999, citado por Artés, 2003).

También han sido probadas variantes de tratamientos térmicos con otro tipo de tratamientos poscosecha con resultados positivos como métodos fungicidas alternativos. Una combinación del tratamiento de agua caliente a 46°C y la levadura *Rhodotorula glutinis* controló la pudrición de *Penicillium expansum* en pera (Zhang *et al.*, 2008). En frutos de piña inoculada con esporas de *Chalara paradoxa*, seguido de un baño de agua caliente en 54°C durante 3 minutos dio buenos resultados en el control del hongo *Thielaviopsis* (Wijeratnam *et al.*, 2005).

#### 2.5.4.2 Tratamientos químicos

La aplicación de diversos antioxidantes como la etoxiquina, la difenilamina, el benzoato sódico, el 1-MCP, vapores de etanol, fungicidas como el benomilo, disoluciones de calcio (mayores concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  en los tejidos se ha asociado con menor susceptibilidad a DF), la mayoría de reguladores del crecimiento al afectar a procesos bioquímicos y fisiológicos que pueden a su vez afectar a la tolerancia al estrés por frío (etileno, ácido giberélico o ácido jasmónico entre otros), e incluso las poliaminas (por su actividad antioxidante) se han mostrado eficaces para reducir algunos DF en frutos climatéricos como la manzana, pera y aguacate, y no climatéricos como cítricos, pimiento, pepino y calabacín (Artés, 2003).

El interés de las poliaminas en el proceso de maduración de los frutos parece estar asociado con el hecho de que el etileno y las poliaminas son antagónicos y que durante el proceso de biosíntesis comparten el mismo intermediario (S-Adenosinmetionina) (Faust y Wang, 1992). Las poliaminas, durante la poscosecha están asociadas al mantenimiento de la firmeza contribuyendo a reducir la incidencia de los daños mecánicos y deformación en frutas (Pérez-Vicente *et al.*, 2001).

El calcio está considerado como el principal responsable de la formación de la lámina media, estructura y permeabilidad de la pared celular. Además es el elemento que más influencia tiene en el retraso de la senescencia (Saborío, 2000). Marschner (1995), señala que bajas concentraciones de calcio en el fruto aceleran

los procesos de senescencia y que cualquier aumento de ésta concentración, por pequeña que sea, ayuda a prevenir o a disminuir drásticamente las pérdidas económicas que ocasionan las enfermedades asociadas con el almacenamiento. Tratamientos con sales de calcio han determinado que se puede ayudar a mantener la textura de los frutos, disminuir la producción de CO<sub>2</sub> y etileno, y reducir la degradación interna y podredumbre de los frutos (Poovaiah, 1986 citado por Saborío, 2000).

En ensayos realizados en tomate por Naram Naidu *et al.* (2013), se aplicaron tratamientos con CaCl<sub>2</sub> al 1 y 2% y se conservaron los frutos a temperatura ambiente durante 14 días, observándose que la actividad de las enzimas responsables del ablandamiento de la pared celular, poligalacturonasa (PG) y pectina-metil-esterasa (PME), se incrementó gradualmente durante el almacenamiento alcanzando su pico en el noveno día después de almacenamiento, seguido de un descenso hacia el final del almacenamiento, mientras que la firmeza de los frutos disminuyó gradualmente durante almacenamiento. Aunque el patrón de cambios observados fue similar para todos los tratamientos incluyendo el control, la actividad enzimática fue relativamente baja y la tasa de disminución de la firmeza fue mucho menor en los frutos tratados que en los no tratados.

En manzana, Ghafir *et al.* (2013) observaron tras sumergir los frutos en una disolución al 1% de CaCl<sub>2</sub> y almacenarlos durante seis meses a 0°C, que la tasa de ablandamiento fue notablemente más lenta, con menor pérdida de peso y firmeza en los frutos tratados que en los no tratados. En fresa, Rahman *et al.* (2013), observaron que inmersiones en soluciones de CaCl<sub>2</sub> al 1% durante 15 min a 45°C y el almacenamiento posterior a 10°C durante 8 días, disminuyeron la cantidad de DF de la superficie de los frutos, mantuvieron una mejor firmeza y redujeron la pérdida de peso, la descomposición por hongos y los cambios de color en comparación con los frutos no tratados.

La difenilamina es un antioxidante que actúa como inhibidor de la oxidación de  $\alpha$ -farnaseno y por lo tanto, evita la acumulación de compuestos tóxicos, reduciendo la tasa de maduración (Lurie *et al.*, 1989). También disminuye la

respiración de los frutos, así como de los tejidos de la piel (Sims, 1962). Laurie *et al.* (1989), encontraron que la difenilamina prevenía la producción de etileno, afectando a sistemas oxidativos implicados en la calidad fisiológica de los frutos en poscosecha, reduciendo la actividad de enzimas oxidantes como la polidenoloxidasa, peroxidasa y lipooxigenasa responsables entre otras, del estrés oxidativo. También evitó la oxidación de la clorofila, manteniendo más tiempo el color verde de los frutos.

Las aplicación de difenilamina puede reemplazar antioxidantes endógenos, como el ácido ascórbico y el  $\alpha$ -tocoferol, que normalmente decrecen a medida que los tejidos se acercan a la senescencia, y por tanto puede inhibir el incremento del proceso oxidativo que acompaña la senescencia (Lurie *et al.* 1989).

En ensayos realizados por Lurie *et al.* (1989), en manzanas *Granny Smith* conservadas en frío durante cuatro meses tras ser tratadas con una disolución de difenilamina en agua, y almacenadas posteriormente durante 14 días a temperatura ambiente, se observó que los frutos tratados redujeron la producción de etileno entre un 11 y un 39%, así como la tasa de respiración. Ésta reducción produjo una inhibición del proceso de maduración, presentando la fruta tratada mayor firmeza, mayor acidez y una coloración más verde. A su vez, el tratamiento con difenilamina redujo el desarrollo de algunas fisiopatías como el decaimiento interno, el core flush y podredumbres, debido a la inhibición de los procesos oxidativos. Estos mismos autores encontraron resultados similares, aunque algo menores en pera.

Hay numerosos ensayos realizados en manzana (Song *et al.*, 2014; Zanella *et al.*, 2014; Leisso *et al.*, 2013) donde se han observado efectos positivos contra la escaldadura de la manzana por su actividad antioxidante, y en mango (Motomura *et al.*, 2013) reduciendo los pardeamientos en la piel. También se ha observado que suele tener poca penetración en frutos y una alta permanencia de residuos, encontrándose niveles altos de difenilamina en el aire de cámaras frigoríficas con manzanas sin tratar, pero que contenían material que estuvo en contacto con manzanas tratadas (Song *et al.*, 2014).

Se ha visto que existen ciertos productos naturales y sus derivados como el metiljasmonato (MJ) y el metilsalicilato (MS), componentes volátiles, que tienen efectos retardando los daños por frío en distintas especies incluido el calabacín. Estas sustancias mejoran la resistencia de los tejidos a los daños por frío al aumentar la expresión genética de proteínas de choque térmico, proteínas relacionadas con el proceso de patogénesis, y oxidasa alternativa. Además el MJ aumenta la capacidad antioxidante, la actividad de las enzimas antioxidantes, y reduce la capacidad de degradación de los tejidos por los radicales libres. Es decir, el MJ previene el daño por frío mediante un mecanismo que implica la protección de los tejidos del daño de los radicales libres (Wang, 2006).

Sin embargo, a pesar de los resultados positivos obtenidos con tratamientos químicos, cada vez se tiende más a la aplicación de otro tipo de tratamientos como tratamientos físicos, erradicando el uso de sustancias químicas, por la preocupación del mercado por el empleo de estas sustancias, que pueden dejar residuos y son potencialmente nocivas para la salud y el medio ambiente.

#### **2.5.4.3 Tratamientos gaseosos. Atmósferas modificadas**

Este tipo de tratamientos consisten principalmente en modificar las concentraciones de CO<sub>2</sub> y de O<sub>2</sub>, con lo que se consigue modificar el comportamiento del fruto que se traduce en la prolongación de la vida comercial.

Beaudry (1999) agrupa los efectos de la manipulación del O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> en efectos sobre la producción de etileno, efectos sobre el metabolismo primario y efectos sobre el metabolismo secundario. El aumento de la presión parcial del CO<sub>2</sub> y la disminución de la presión parcial de O<sub>2</sub> disminuyen la respuesta del etileno; si la presión parcial del O<sub>2</sub> disminuye a 2,8 kPa o si la del CO<sub>2</sub> aumenta hasta 1,55 kPa el etileno se inhibe, con lo cual se puede afirmar que la modificación de la atmósfera retrasa el proceso de maduración en frutos climatéricos, no sólo porque disminuye la actividad respiratoria, sino porque se disminuye la acción del etileno. Por otro lado, Si la presión parcial de O<sub>2</sub> se reduce a niveles menores de 2 kPa, disminuyen la

disponibilidad de esqueletos de carbono y la energía para la síntesis de proteínas, induciéndose la fermentación. Dicha condición puede agravarse si las presiones parciales de CO<sub>2</sub> alcanzan niveles de 20 kPa; aún con concentraciones de 5 kPa de CO<sub>2</sub> se ha encontrado que se disminuye la utilización de azúcares.

En general, la degradación de la clorofila, el pardeamiento por acción de la polifenoloxidasas y la síntesis de compuestos volátiles disminuyen con la bajada de la presión parcial de O<sub>2</sub> (Mathooko 1996).

La atmósfera modificada (AM) se logra envasando órganos vegetales con una película de polímero plástico, relativamente permeable a los gases del aire (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Vapor de H<sub>2</sub>O y C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) donde se crean unas condiciones de baja concentración de O<sub>2</sub> y alta CO<sub>2</sub> provista de un cierre hermético. La atmósfera modificada puede hacerse de forma activa, por inyección de una mezcla de gases de una composición dada dentro del envase; o pasiva, donde la permeabilidad a los gases (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etileno y vapor de agua) de la película plástica y la respiración del propio producto permitirá la creación de una atmósfera de equilibrio (Church, 1994) baja en O<sub>2</sub> y alta en CO<sub>2</sub>. Este tipo de atmósferas modificadas pasivas, en las que se consigue un contenido del 2-5% de O<sub>2</sub> y del 3-8% de CO<sub>2</sub>, han demostrado un retraso de la maduración y disminución del ablandamiento y pérdida de peso, así como una reducción de la degradación de la clorofila, las podredumbres microbiológicas y los pardeamientos enzimáticos en pepino, donde son de uso habitual.

Es un método complementario del frío y su principal efecto es la reducción de la intensidad respiratoria, retrasando la aparición del climaterio, o en algunos casos, desapareciendo el pico climatérico (Kader 1986; 1992).

En especies como manzana y pera la degradación de ácidos orgánicos se reduce en condiciones de atmósfera modificada o controlada, dicha reducción puede ser explicada como un incremento en la fijación del CO<sub>2</sub>, reducción de la respiración y un menor consumo de los mismos (Beaudry 1999).

Se ha comprobado que algunas atmósferas controladas (AC) como aire enriquecido en más de un 20% de CO<sub>2</sub>, reduce DF además de podredumbres en

cítricos, aguacate, pimienta y nectarina, en efecto positivo en la firmeza de ésta última (Artés, 1995c citado en Artés, 2003). La aplicación de las AM y AC se efectúa manteniendo una elevada tensión de vapor de agua alrededor de los productos, cuyo efecto beneficioso para evitar los DF puede enmascarar la acción de la atmósfera (Artés, 2003).

En calabacín y melón conservado 16 días a 10°C, con niveles de CO<sub>2</sub> próximos al 10%, se inhibieron los efectos nocivos del etileno acumulado en el interior de los envases, con mejoras en el ablandamiento, color, aroma y sabor, y prolongando la vida comercial (Rodov et al., 1998 citado por Artés 2003). Estos mismos autores observaron que en pepino durante 14 días a 7°C, redujo DF típicos como el picado, ablandamiento y la susceptibilidad a podredumbres, aunque no inhibió el amarilleamiento interno.

Condiciones de hipoxia severa (niveles muy bajos de O<sub>2</sub>), permite mejorar la firmeza y disminuir los DF en manzana (Blanpied, 1982 citado por Artés, 2003). La razón de este efecto puede relacionarse con la disminución del estrés oxidativo.

Los recubrimientos cerosos, o con aceites vegetales o minerales, o con silicona y los envases plásticos suelen resultar muy efectivos para evitar los DF, al limitar los intercambios gaseosos y retrasar la deshidratación (Wang, 2000 citado por Artés, 2003). Los tratamientos cerosos y plásticos son comunes en cítricos y en frutos de pepita. Los recubrimientos cerosos intentan devolver al fruto la capa de ceras naturales perdidas en el lavado-cepillado, para reducir las pérdidas de peso y mejorar su apariencia, aumentando el brillo natural, sin aportar residuos ni perjudicar al consumidor o al ambiente (Artés, 2003).

En tomate Daniela pintón, se conservó sin DF hasta 3 semanas a 9°C en bolsas de polipropileno perforadas y herméticas incluso después de 3 días complementarios a 20°C (Artés, 1999a). Resultados similares se han obtenido en manzana, pera, plátano y pepino (Estrada, 2014). También el picado y la escaldadura del pimienta y de los cítricos se llegan a inhibir con una envoltura plástica (Ben-Yehoshua et al. 1983; Chun et al., 1988, citados por Artés, 2003).

En frutos de pepino, una cucurbitácea como el calabacín, la técnica de plastificado es habitualmente utilizada sobre todo para frutos cuyo destino es la exportación, al conservar las propiedades y la calidad de los frutos durante más tiempo. Consiste en envolver los frutos individualmente con un film plástico de polietileno termorretractil, que se sella herméticamente mediante la aplicación de calor, quedando los frutos envueltos en una segunda piel que mantiene su frescura hasta su destino final.

Numerosos estudios han comprobado la eficacia del plastificado en el pepino como tratamiento poscosecha. Rajinder *et al.* (2012), observaron que en frutos de pepino plastificados y se almacenados a  $12\pm 1^{\circ}\text{C}$  y 90-95% de humedad relativa, y trasladados posteriormente a temperatura ambiente durante 5 días, la pérdida fisiológica de peso fue mínima (0,66%) en comparación con los frutos sin plastificar (11,11%) al final del almacenamiento refrigerado (15 días). El ablandamiento (pérdida de firmeza) fue máximo (1.304,6 a 876,6 g de fuerza) en los pepinos sin plastificar, mientras que en retractorilado, se observó una pérdida mínima en la firmeza (1304,6 a 1065,3 g de fuerza) después de 12 días de almacenamiento a  $12\pm 1^{\circ}\text{C}$  y 90-95% de humedad relativa. Ésta pérdida de peso y firmeza hizo que los pepinos sin plastificar fueran no comerciales después de 9 días de almacenamiento. Tras 15 días de almacenamiento, tampoco se observó pérdida de color y la calidad sensorial fue más alta en retractorilado en comparación con los pepinos sin tratar al final del almacenamiento.



# 3 | **Material y Métodos**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Localización del ensayo

El ensayo se realizó en los diferentes laboratorios del área de Fisiología Vegetal y del área de Genética del departamento de Biología y Geología, de la Universidad de Almería, situados en el edificio de la Escuela Politécnica Superior y Facultad de Ciencias Experimentales y en el edificio Científico Técnico II-B.

#### 3.2 Material vegetal

Se utilizaron frutos de tres variedades de calabacín:

- *Victoria*: Pertenece a la casa comercial *Clause*. Es una variedad de fruto alargado y color verde oscuro, adecuada para su siembra a principio de Julio hasta mitad de Septiembre y en primavera, debido a que tiene buena fructificación con temperaturas altas. Es resistente a oídio y a ZYMW y WMV.
- *Sinatra*: Pertenece a la casa comercial de *Clause*. Es una planta vigorosa, de ciclo productivo largo y con buena producción en los meses fríos, por lo que recomienda para siembras a partir de mediados de octubre en invernadero. Fruto de color verde oscuro, brillante, con máculas de pequeño tamaño, cilíndrico y muy liso.
- *Natura*: Pertenece a la casa comercial *Enza Zaden*. Es una variedad adecuada para su siembra a mediados de Septiembre y Octubre. Se trata de una variedad de un vigor fuerte con fruto oscuro, brillante y cilíndrico cuyo tamaño oscila entre 20-25 cm.

Los frutos de las tres variedades fueron cosechados en diferentes invernaderos privados del municipio de El Ejido, y facilitados el mismo día de su recolección por la empresa *Frutas Escobi S.L.* desde donde fueron transportados en

cajas hasta los laboratorios de la UAL a temperatura ambiente (RT). Durante ese mismo día de la cosecha y una vez en el laboratorio, los frutos fueron limpiados y clasificados para eliminar todos aquellos frutos dañados o magullados o con algún síntoma de enfermedad o fisiopatía para así disponer de muestras uniformes en color, tamaño, y calidad que fueran representativas del fruto tipo de cada variedad.

### 3.3 Tratamientos

Para las tres variedades, se separaron los frutos en siete lotes de 22 frutos cada uno, correspondientes a cada uno de los siete tratamientos a los que se someterían los frutos, y se rotularon para numerar cada uno de los calabacines. Los tratamientos fueron:

- *Acondicionamiento*:  $12\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas previo a su almacenamiento.
- *Plastificado o Retractilado*: los frutos se plastificaron con un film de polietileno termorretráctil. En este proceso se sella herméticamente cada fruto individualmente con un film plástico, que mediante la aplicación de calor, se adhiere a la superficie del fruto aislándolo del entorno. Éste tratamiento se realizó en la empresa que facilitó los frutos pocas horas después de su recolección.
- *Cloruro cálcico*: se sumergieron los frutos en una disolución de  $\text{CaCl}_2$  en agua al 2% durante 5 minutos. Posteriormente los frutos se dejaron secar, eliminando el exceso de agua que pudiera quedar y evitar así pudriciones.
- *Difenilamina*: se sumergieron los frutos en una disolución de difenilamina y agua al 1% durante 5 minutos. Igual que para el tratamiento anterior, posteriormente los frutos fueron secados.
- *Curado en agua a  $37^{\circ}\text{C}$* : los frutos sometidos a éste tratamientos se sumergieron en agua a temperatura constante de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.

- *Curado en agua a 42°C*: se sumergieron los 22 frutos en un baño de agua a temperatura constante de 42°C durante 5 minutos.
- *Control*: a los frutos de este lote no se les aplicó ningún tipo de tratamiento para usarlos como control y poder realizar una comparativa con los frutos que sí fueron sometidos a alguno de los tratamientos anteriormente mencionados.

Una vez realizados estos tratamientos, los frutos organizados en sus respectivos lotes, se trasladó a la cámara frigorífica a 4±2 °C durante 14 días.

### **3.4 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, y los tratamientos se aplicaron de acuerdo a un diseño factorial con tres réplicas de 22 frutos por tratamiento.

### **3.5 Parámetros medidos en el ensayo**

#### **3.5.1 Daños por frío**

Para la evaluación de los daños por frío se sometieron a un análisis visual los 22 frutos de cada tratamiento de la variedad *Victoria*. Se tuvo en cuenta la superficie dañada, la gravedad (profundidad de los punteados o *pitting* producidos por el frío) y una ponderación de ambos, denominado índice global de DF (Megías *et al.*, 2012).

Los valores de DF para la valoración de la superficie dañada fueron:

**1** = menos del 5% de la superficie del fruto

**2** = 5-15 % la superficie del fruto

**3** = 16-25 % la superficie del fruto

**4** = 26-50 % la superficie del fruto

**5** = 51-100 % la superficie del fruto

Los valores de DF para la valoración de la gravedad de los daños fueron:

**1** = Muy leves

**2** = Leves

**3** = Moderado

**4** = Graves

**5** = Muy graves

Las determinaciones se realizaron a los 2, 7, 11 y 14 días de conservación de los frutos en cámara frigorífica a 4°C.

### **3.5.2 Producción de etileno**

*Equipo utilizado:*

- Cromatógrafo de gases *Varian 3900* con detector por ionización de llama.

Para la medición de la producción de etileno se realizaron medidas a los 0, 7 y 14 días de conservación a 4°C en cámara frigorífica de los frutos de la variedad Victoria. Se introducían en botes herméticos 3 frutos por bote y repetición, de cada uno de los tratamientos durante 6 horas a temperatura ambiente (RT = 20°C) para que acumularan etileno. Transcurrido este tiempo de acumulación, se extraían 5 ml del aire de la atmósfera del bote mediante una aguja hipodérmica través de la boquilla estanca del bote, y se inyectaban en el cromatógrafo (de los cuales el equipo analiza 2 mL) para determinar la concentración de etileno. Ésta medida se repetía 3 veces por cada uno de los botes.



Figura 3.1. Medición de etileno en el cromatógrafo.

### 3.5.3 Respiración

*Equipo utilizado:*

- Analizador fijo de O<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub> *CheckMate II*.

Tras realizar la medición para etileno, se introducía la aguja del analizador directamente en la boquilla estanca de los botes herméticos, que nos devolvía la medida en porcentaje de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> que contenían los botes. Se efectuaron 3 medidas por bote. Para obtener el valor de la tasa respiratoria se usó la siguiente fórmula:

$$\text{CO}_2 \text{ (ml)} = (\% \text{CO}_2 * 100) / (\text{Peso (Kg)} * 6\text{h})$$

$$\text{O}_2 \text{ (ml)} = (\% \text{O}_2 * 100) / (\text{Peso (Kg)} * 6\text{h})$$

Donde:

%CO<sub>2</sub> y %O<sub>2</sub>: valor de la medida directa del analizador.

Peso: peso total de los calabacines contenidos en el bote.



Figura 3.2. Medición de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.

### 3.5.4 Pérdida de peso

*Equipo utilizado:*

- Báscula de precisión modelo *EKS Electronic* de tara máxima 2.000 g y sensibilidad de  $\pm 1$  g.

Para el análisis de la evaluación de la pérdida fisiológica de peso se tomaron las medidas en la báscula de los 22 frutos de cada uno de los siete tratamientos de la variedad *Victoria*, conservados en cámara frigorífica en condiciones controladas de temperatura ( $4 \pm 2$  °C) y humedad relativa (60-80%) a los días 0, 7 y 14 de refrigeración.

La pérdida fisiológica de peso se expresó como porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{(P_0 - P_x)}{P_0} \times 100$$

Donde:

P<sub>0</sub>: peso inicial

P<sub>x</sub>: peso a los distintos tiempos medidos (día 7 y día 14)



Figura 3.3. Pesado de frutos.

### 3.5.5 Actividad oxidativa

En muestras de exocarpo de los frutos de las variedades Sinatra y Natura mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A los días 0, 7 y 14 de frigoconservación, se les midió el contenido en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en malonaldehído (MDA).

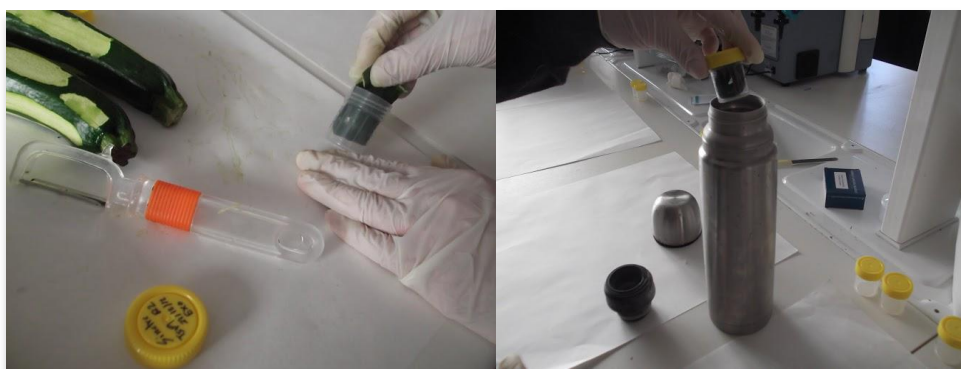


Figura 3.4. Extracción de muestra de exocarpo y conservación en nitrógeno líquido.



Previo al análisis, las muestras serán pulverizadas para facilitar su manejo posterior con nitrógeno líquido para mantener en todo momento la temperatura constante a  $-80^{\circ}\text{C}$  y evitando así que se desencadenen reacciones fisiológicas no deseadas del material vegetal que pudieran afectar a los resultados del trabajo.



**Figura 3.5. Pulverizado de exocarpo con nitrógeno líquido.**

### **3.5.5.1 Peróxido de hidrógeno**

*Equipo utilizado:*

- Buffers yoduro potásico, fosfato potásico y TCA (0,1%). Preparados según Green (1993).
- Centrifuga *Sartorius Spincontrol Universal* de 14.500 rpm.
- Lector de placas *Power Wave XS BioTek*.
- Balanza de precisión.
- Material de laboratorio: morteros, pipetas, tubos Eppendorf, nitrógeno líquido, hielo, lancetas, guantes, etc.

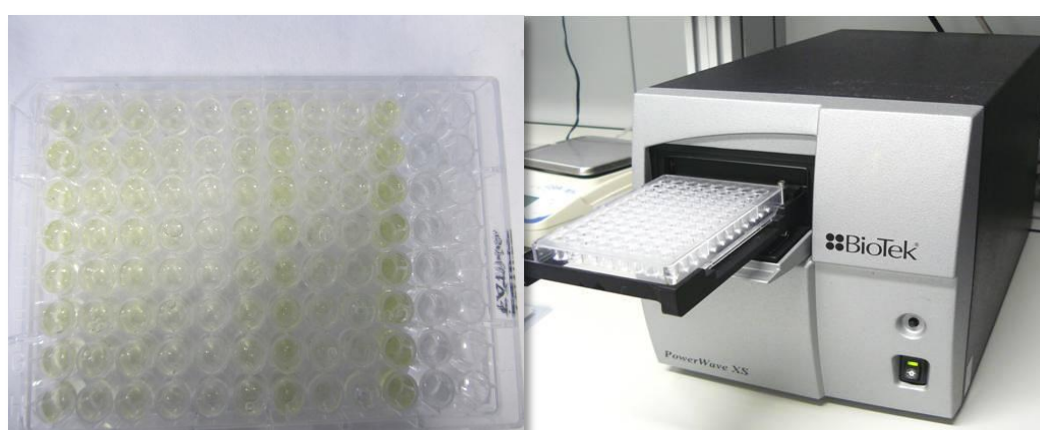
Para llevar a cabo esta medida se siguió el protocolo de Alexieva *et al.* 2001 (adaptado).

En primer lugar se maceraron en mortero 0,5 g de las muestras conservadas de exocarpo de cada repetición, tratamiento y variedad (81 en total) con 1,2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). Una vez formada una pasta homogénea se llevaban a un tubo Eppendorf y se conservaban en hielo.

Cuando todas las muestras estaban maceradas, se llevaban a centrifugar a 12.000 g durante 15 min y a temperatura constante de 4°C.

Una vez centrifugadas, se preparaba la reacción en sus respectivos tubos Eppendorf para cada muestra, que consistía en mezclar 250 µL del sobrenadante resultado de la centrifuga (las muestras) con 250 µL de buffer fosfato potásico 0,1M pH7 y 500 µL de yoduro potásico 1M (en agua). De la misma forma también se prepararon los blancos, en los que se sustituía el sobrenadante del resto de reacciones por 250 µL de TCA 0,1 %.

Preparadas todas las reacciones, se incubaban en oscuridad durante 60 minutos para posteriormente cargar las placas con el contenido resultante con la ayuda de una pipeta de 0,2 mL y medir la absorbancia a 390nm.



**Figura 3.6. Medición de la absorbancia en lector de placas.**

El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se expresó como µmol/g de peso fresco (FW) y se calcula a partir de una curva patrón de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que va de 0 a 150 mM.

### 3.5.5.2 Malondialdehído

*Equipo utilizado:*

- Buffers BHT, TCA (20%) y TBA (0,5 %). Preparados según Green (1993).
- Centrifuga *Sartorius Spincontrol Universal* de 14.500 rpm.
- Lector de placas *Power Wave XS BioTek*.
- Balanza de precisión.
- Baño de agua con control automático de temperatura.
- Material de laboratorio: morteros, pipetas, tubos Eppendorf, nitrógeno líquido, hielo, lancetas, guantes, etc.

Para llevar a cabo la medida del contenido en malondialdehído (MDA) se siguió el protocolo de Ohkawa *et al.* 1979 (adaptado).

Se comenzó macerando 0,3 g de exocarpo de cada una de las muestras (81 en total) en mortero con 200 µL de BHT y 1 ml de TCA (20%) (p/v). Una vez obtenida una pasta marrón homogénea, se traslada a sus respectivos tubos Eppendorf.

Todas las muestras maceradas se llevan a centrifuga a 10.000 g durante 15 min a una temperatura constante de 4°C. 250 µL del sobrenadante obtenido tras centrifugar cada una de las muestras, se mezclaron con 750 µL de TCA 20% + TBA 0,5% en sus respectivos tubos Eppendorf para llevar a cabo la reacción. También se prepararon los blancos, en los que se sustituyeron los 250 µL del sobrenadante obtenido tras la centrifugación por 250 µL de TCA 20%.

Una vez preparada esta mezcla de reactivos, se agitaron los tubos y se incubaron a 94°C durante 30 min en un baño de agua. En el transcurso de este procedimiento se observaba un cambio de color del contenido de los tubos Eppendorf. Pasados esos 30 min se introducían los tubos en hielo para parar súbitamente la reacción durante 10 min, tras los cuales se procedía a centrifugarlos a 10.000 g durante 15 min a 4°C.

Tras la centrifugación se procedía a cargar las placas del lector con una pipeta de 0,2 mL para medir la absorbancia a 532 y 600 nm.



**Figura 3.7. Preparación de la reacción y medición de muestras.**

El contenido en malondialdehído (MDA) se expresará como nmol/g de peso fresco (FW) y se calcula a partir de una curva patrón de MDA que va de 0 a 20 mM.

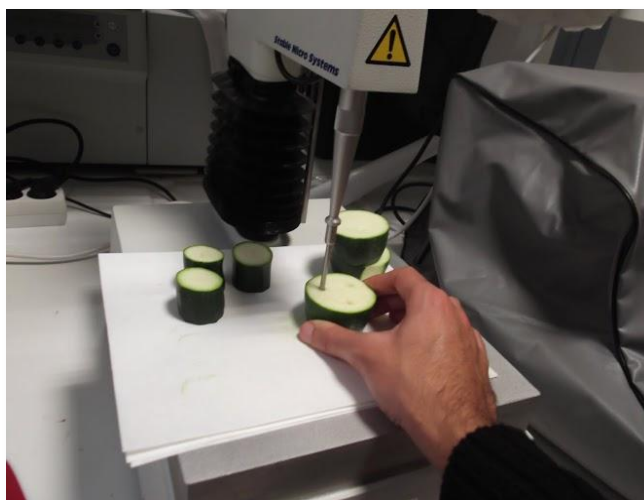
### **3.5.6 Evaluación de la firmeza**

*Equipo utilizado:*

- Texturómetro *Stable Microsystem TA-XTPPlus*.

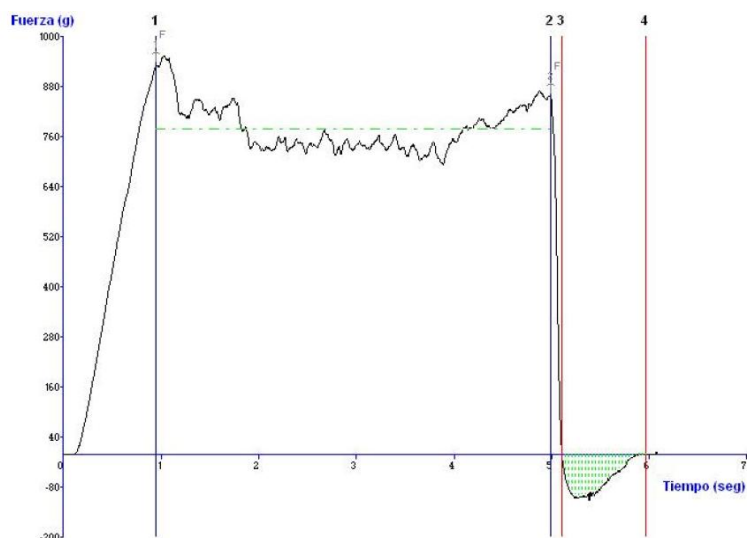
Una vez realizadas las medidas de gases, se abrían los botes y se extraían los tres frutos. Se cortaron rodajas transversales de 2 cm de espesor

aproximadamente de la zona apical de cada uno de los tres frutos de las tres repeticiones y para cada tratamiento de la variedad *Victoria*, para los días 0, 7 y 14 de conservación a 4°C. Sobre las rodajas obtenidas de cada fruto se aplicó un ensayo de penetración de 1 cm de profundidad, de tres repeticiones por fruto (189 en total).



**Figura 3.8. Medida de firmeza de frutos.**

En cada análisis se midió la fuerza media necesaria para que la sonda penetre 1 cm en el fruto (directamente relacionada con la firmeza del fruto), para estudiar si se ve influenciada por los distintos tratamientos empleados. Al realizar la medición, el texturómetro nos devolvía el siguiente tipo de medida:



**Figura 3.9. Representación del perfil de textura de calabacín medido por el texturómetro.**

Cada punto de esa gráfica representa una medida diferente de la textura del fruto. Así, el punto 1 representa la fracturabilidad, el recorrido entre el punto 1 y el punto 2 representa las variaciones de fuerza que se han de realizar para que la sonda penetre un centímetro en la pulpa del calabacín, manteniendo una velocidad constante y se elige como punto de referencia el valor justo anterior a que la fuerza torne a cero y representa la firmeza (el valor medio de los valores del recorrido 1-2 es el que hemos tomado como firmeza en este trabajo). La superficie sombreada representa la adhesividad de la pulpa a la sonda. (Bourne *et al.*, 1978).

### 3.5.7 Contenido en clorofilas del exocarpo

*Equipo utilizado:*

- Medidor de contenido en clorofila *Hansatech CL-01*.
- Gradilla, tubos de ensayo, etanol, parafilm, sacabocados y agitador.

- Baño de agua control automático de la temperatura.
- Espectrofotómetro *Thermo Genesys 20*.
- Balanza de precisión.

La evaluación del contenido en clorofila se realizó sobre el exocarpo de tres replicas biológicas, con tres repeticiones para cada uno de los tratamientos y variedad los días 0, 7 y 14 de almacenamiento en cámara frigorífica mediante dos métodos:

1. *Medidor de contenido en clorofila:*

Las medidas se tomaron insertando muestras finas de exocarpo en el cabezal del medidor y anotando el valor de la medida obtenida.



**Figura 3.10. Medición del contenido en clorofilas.**

## 2. Cuantificación de clorofilas mediante método analítico:

Para esta determinación se aplicó una variante del método espectrofotométrico propuesto por Hansmann, 1973. De éste modo, se obtuvieron taleolas de cada una de las muestras de exocarpo, se pesaron en la balanza de precisión y se pusieron en sus respectivos tubos de ensayo con 5 ml de etanol y sellados con parafilm. La mezcla se agitó y dejó reposar durante 24h en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, las taleolas se observaban de color blanco por la extracción de las clorofilas por el etanol. Se volvieron a agitar y se procedió a la lectura de la densidad óptica a 440 nm, 645 nm y 663 nm en el espectrofotómetro, usando como blanco el disolvente extractor (etanol).



**Figura 3.11. Extracción de clorofila y medida de absorbancia.**

Para la cuantificación se utilizó la ecuación propuesta por Arnon (1949 citado en Bruinsma, 1963):

$$\text{Clorofila a (mg/g)} = 12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645}$$

$$\text{Clorofila b (mg/g)} = 22,9 * A_{645} - 4,68 * A_{663}$$

$$\text{Carotenos (mg/g)} = A_{440} * 50 / 2592 * P$$

Siendo:



$A_{663}$  = medida de la absorbancia a 663 nm

$A_{645}$  = medida de la absorbancia a 645 nm

$A_{440}$  = medida de la absorbancia a 440 nm

P = peso de la muestra

### 3.5.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa *Statgraphics Centurion XVI.1* para *Windows*<sup>®</sup>. Todos los datos se sometieron a análisis de la varianza ANOVA simple (de acuerdo con un diseño al azar) y a un test estadístico de comparación de medias LSD (mínimas diferencias significativas de Fisher) con un nivel de significación de  $p \leq 0,05$ .

Para datos que no seguían una función lineal (caso de los daños frío), en los que no se puede usar un test estadístico de comparación de medias LSD, se utilizó el análisis de datos de Krukal-Wallis.

# 4 | Resultados y Discusión

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Efectos de los tratamientos sobre los daños por frío

Uno de los síntomas más importantes de los daños por frío (DF) en calabacín apreciable a simple vista cuando se conservan los frutos a baja temperatura pero superior al punto de congelación, es la presencia de hundimientos en la piel denominados *pitting* o picado.



Figura 4.1. Pitting en calabacín.

Para evaluar la intensidad de los DF se ha tenido en cuenta la superficie de estas áreas afectadas, la gravedad o grado de profundidad de las mismas y un índice global (IG), resultado de un promedio de las anteriores. Los resultados obtenidos para el grado de superficie afectada por DF en frutos de la variedad *Victoria* conservados a 4°C a los días 4, 7, 11 y 14, se muestran en la Tabla 4.1

| Tratamiento | Control  | Plastif. | Acondic. | 37°C      | 42°C     | CaCl <sub>2</sub> | Difenil. |
|-------------|----------|----------|----------|-----------|----------|-------------------|----------|
| Día 4       | 1,90 Bbc | 1 Cd     | 1,66 Bc  | 2,04 Bb   | 1,72 Bc  | 1,81 Bbc          | 1,83 Cbc |
| Día 7       | 2,18 Bc  | 1,42 Bd  | 1,52 ABd | 2,22 ABc  | 2 ABc    | 2,31 Ac           | 2,66 Bb  |
| Día 11      | 3 Ab     | 1,92 Ad  | 2 Adc    | 2,30 ABcd | 2,07 Acd | 2,46 Ac           | 3,66 Aa  |
| Día 14      | 3,08 Ab  | 2,07 Ad  | 2,07 Ad  | 2,53 Acd  | 2,16 Ad  | 2,72 Abc          | 3,66 Aa  |

**Tabla 4.1. Superficie de los daños por frío en los frutos conservados durante 4, 7, 11 y 14 días a 4°C. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los diferentes días por tratamiento ( $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).**

Para los tres días de frigoconservación se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos realizados y entre los diferentes días de almacenamiento. La tendencia de la superficie dañada es a aumentar con el tiempo, tendencia que se aprecia de forma más acusada en los tratamientos de difenilamina, control, y CaCl<sub>2</sub>. Por el contrario, en los tratamientos de acondicionamiento, plastificado, y el baño a 42°C, apenas aumenta la superficie afectada desde el día 4, lo que puede indicar un efecto positivo de éstos en la reducción del efecto de los DF en cuanto a la superficie de los mismos.

La gravedad de los DF hace referencia a la profundidad de las superficies deprimidas que se desarrollan en el fruto por efecto de la conservación en frío. Los resultados obtenidos para el parámetro gravedad pueden apreciarse en la tabla 4.2.

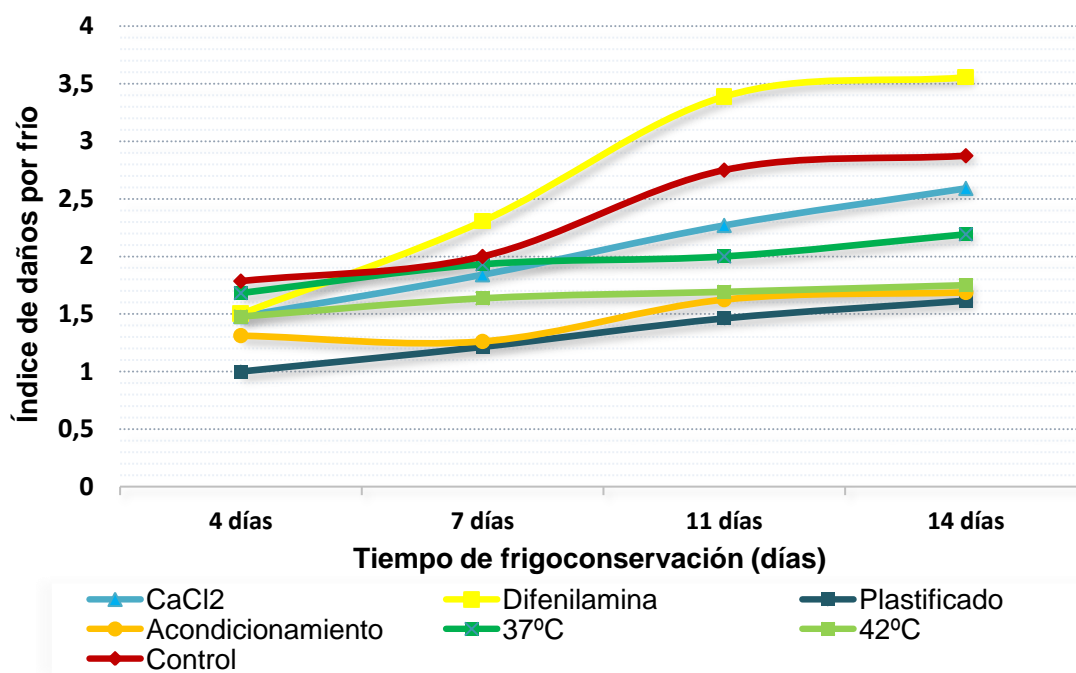
| Tratamiento | Control | Plastif. | Acondic. | 37°C      | 42°C     | CaCl <sub>2</sub> | Difenil. |
|-------------|---------|----------|----------|-----------|----------|-------------------|----------|
| Día 4       | 1,66 Ba | 1 ABb    | 1 Ab     | 1,31 Bb   | 1,22 Ab  | 1,13 Bb           | 1,16 Cb  |
| Día 7       | 1,81 Ba | 1 Bd     | 1 Ad     | 1,63 ABab | 1,27 Acd | 1,36 Bbc          | 1,94 Ba  |
| Día 11      | 2,41 Aa | 1 Bd     | 1,15 Ad  | 1,69 ABbc | 1,30 Acd | 2,07 Aab          | 3,11 Aa  |
| Día 14      | 2,58 Ab | 1,15 Ad  | 1,15 Ad  | 1,84 Ac   | 1,33 Acd | 2,45 Ab           | 3,44 Aa  |

Tabla 4.2. Gravedad de los daños por frío en los frutos conservados durante 4, 7, 11 y 14 días a 4°C. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los diferentes días por tratamiento ( $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

En cuanto a la gravedad de los DF observamos el mismo comportamiento que presenta el parámetro superficie de DF, experimentándose diferencias significativas para cada día de conservación entre los diferentes tratamientos. El tratamiento con difenilamina es el que presenta una gravedad de los DF mayor. El tratamiento control sigue un desarrollo paralelo al del difenilamina a partir del día 7, aunque de menor intensidad.

Por el contrario, los tratamientos en los que los DF fueron menos graves fueron el de acondicionamiento y plastificado, en los que la gravedad sigue un desarrollo similar al resto de resultados, pero en los que el grado fue leve, incluso muy leve durante los primeros días en el plastificado.

El índice global se ha calculado como promedio del grado de superficie y de gravedad observados. Los resultados obtenidos para IG, se describen a continuación en la Figura 4.2.



| Tratamiento | Control | Plastif. | Acondic.  | 37°C     | 42°C     | CaCl <sub>2</sub> | Difenil. |
|-------------|---------|----------|-----------|----------|----------|-------------------|----------|
| Día 4       | 1,78 Ba | 1 Cd     | 1,31 Ccd  | 1,68 Bab | 1,47 Abc | 1,47 Cbc          | 1,50 Cbc |
| Día 7       | 2 Bb    | 1,21 Bd  | 1,26 BCd  | 1,93 ABb | 1,63 Ac  | 1,84 Bbc          | 2,30 Ba  |
| Día 11      | 2,75 Aa | 1,46 Ad  | 1,62 ABcd | 2 ABbc   | 1,69 Acd | 2,26 Aab          | 3,38 Aa  |
| Día 14      | 2,87 Aa | 1,61 Ad  | 1,68 Acd  | 2,19 Abc | 1,75 Acd | 2,59 Aab          | 3,55 Aa  |

Figura 4.2. Índice global de los daños por frío en los frutos conservados durante 4, 7, 11 y 14 días a 4°C. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los diferentes días por tratamiento ( $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

Como puede observarse en la gráfica, la evolución de los daños por frío a lo largo del tiempo sigue una tendencia creciente en todos los tratamientos, presentando diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y días de conservación, siendo el tratamiento con difenilamina y el control, los que tuvieron menores efectos en la incidencia de los daños por frío. En el caso de la difenilamina éste efecto es mayor que en el tratamiento control, lo que indica que éste

tratamiento no disminuye los efectos de los DF, sino que los aumenta produciendo un mayor índice global de DF.

Por el contrario, los tratamientos de acondicionamiento y de plastificado, dieron unos resultados favorables, reduciendo a la mitad la incidencia de DF en comparación con el tratamiento control, efecto que se observó desde el día 4 de conservación a 4°C en el tratamiento plastificado. El resto de tratamientos también mostraron una mejora de la incidencia de DF en comparación con el tratamiento control, aunque de una forma más moderada que los tratamientos más efectivos.

Estos resultados obtenidos para el parámetro DF, siguen la misma tendencia que los resultados obtenidos por Carvajal *et al.*, (2011). En ese trabajo se estudió el comportamiento de diferentes variedades sin tratar (similares al tratamiento control del presente trabajo) almacenadas durante 14 días a 4°C. Se observó que algunas variedades como *Natura* presentaban un bajo índice de DF (1,8 y 1,3 para los días 7 y 14 respectivamente) y otras como *Sinatra* presentaban índices de DF considerablemente más altos. El tratamiento control de la variedad *Victoria* estudiada en este trabajo se encuentra en valores intermedios comparada con *Natura* y *Sinatra* (Carvajal *et al.*, 2011), lo que puede indicar que la variedad *Victoria* tiene un grado medio de capacidad al almacenamiento en frío, y que éste aumenta considerablemente si se aplican tratamientos como el acondicionamiento o el plastificado.

#### **4.2 Efectos de los tratamientos sobre la pérdida de peso**

A continuación se muestran los resultados de la pérdida de peso para los diferentes tratamientos tras 7 y 14 días de refrigeración en cámara frigorífica a 4°C. En todos los tratamientos la tendencia de la pérdida de peso fue creciente, cada vez mayor conforme aumentaba el tiempo de conservación, algo normal al corresponderse con el aumento del deterioro de los frutos a lo largo del tiempo.

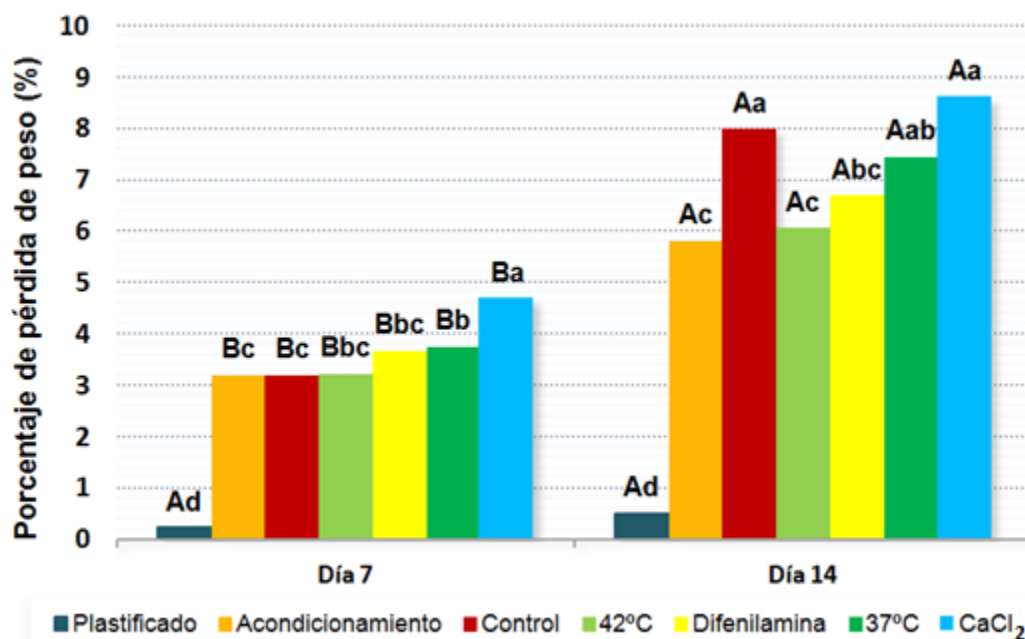


Figura 4.3. Pérdida de peso de los frutos conservados a 4°C durante los 7 y 14 días. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los diferentes días por tratamiento ( $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

Los frutos que experimentaron mayores pérdidas de peso fueron los tratados con  $\text{CaCl}_2$ , con una pérdida del 8,59% de su peso inicial, aunque sin presentar diferencias significativas con respecto al control en el día 14. Los frutos del tratamiento control también experimentaron una pérdida de peso significativa el día 14, aunque ésta pérdida fue similar al resto de tratamientos en el día 7 de refrigeración, siendo incluso menor que en los tratamientos 37°C y  $\text{CaCl}_2$  para ese día.

Los frutos que experimentaron una menor pérdida de peso fueron los correspondientes a los tratamientos 42°C y acondicionamiento, aunque sin diferencias significativas respecto al control en el día 7, y el tratamiento plastificado, en el que fue notablemente baja la pérdida de peso (0,49%) en comparación con el



resto de tratamientos para los días 7 y 14. En trabajos similares en pepino plastificado (Rajinder, 2012), refrigerado a 12°C durante 14 días, se obtuvieron pérdidas de peso del 0,66%, lo que se corresponde con los resultados obtenidos para calabacín en este trabajo, donde las pérdidas fueron menores, posiblemente porque la temperatura de conservación también fue menor.

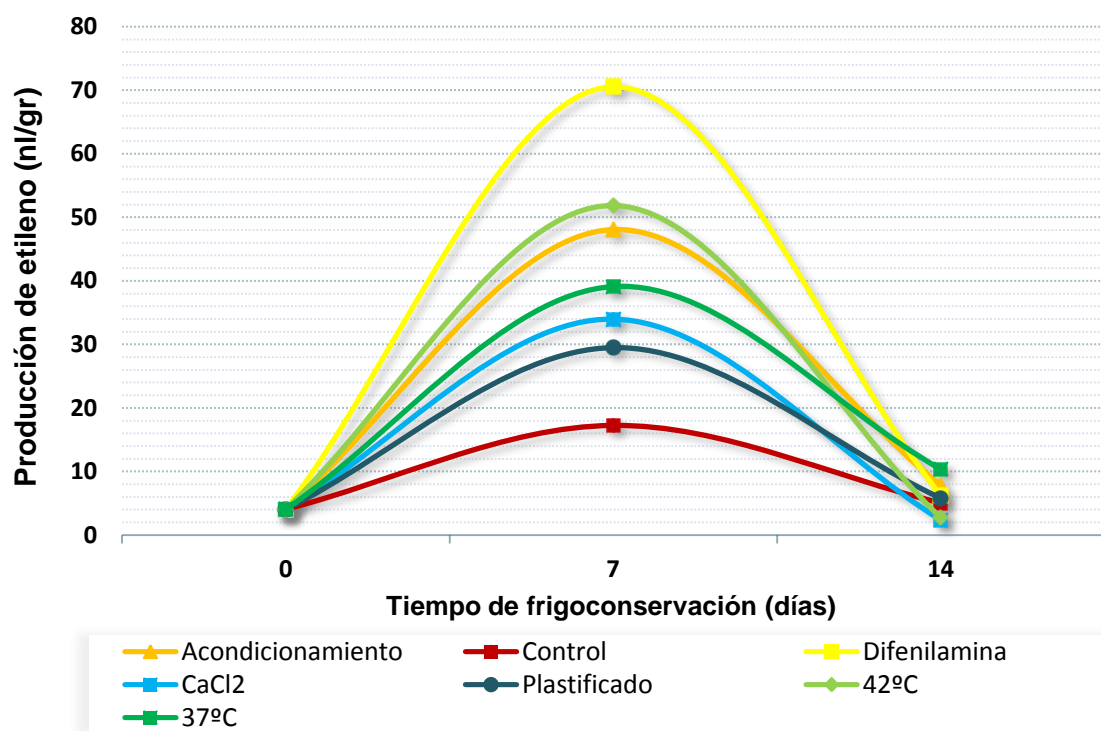
Megías *et al.* (2012) también encontraron esta tendencia en la pérdida de peso de los frutos de diferentes variedades de calabacín, observando que los frutos almacenados en frío (4°C), perdían menos peso que los almacenados a 14°C y estos menos que a 20°C. Sin embargo en los frutos mantenidos en frío, aunque perdieron menos peso, mostraron un mayor índice de DF que devaluaron la calidad de los mismos muy tempranamente.

Los resultados obtenidos también se corresponden con los obtenidos por Carvajal *et al.* (2011), quienes analizaron la resistencia al almacenamiento en frío de distintas variedades de calabacín, observando que en todas las variedades, y en todas las temperaturas ensayadas (4°C, 12°C y 20°C), los frutos mostraron pérdida de peso, dándose la mayor pérdida a la temperatura de 20°C y la menor a la temperatura de 12°C. Comparados con estos resultados, la variedad *Victoria* presentó un mismo comportamiento respecto a la pérdida de peso, siendo menor que en variedades con alta capacidad al almacenamiento en frío como *Natura*, lo que hace indicar que la variedad *Victoria* es más resistente a la pérdida de peso y que el tratamiento de los frutos con un plastificado o un acondicionamiento, tiene efectos positivos, reduciendo la pérdida de peso durante el almacenamiento a 4°C.

### **4.3 Efectos de los tratamientos sobre la producción de etileno**

Varios estudios previos han concluido que el almacenamiento en frío provoca la producción de etileno en calabacín (Balandrán-Quintana *et al.*, 2003). Este etileno inducido por frío no se produce durante el periodo de almacenamiento sino que aumenta rápidamente después de transferir los frutos a temperatura ambiente (Wang y Adams, 1982).

Los resultados de producción de etileno en frutos de la variedad *Victoria* almacenados a 4°C obtenidos fueron los que se muestran a continuación en la Figura 4.4.



| Tratamiento | Control  | Plastif. | Acondic. | 37°C     | 42°C     | CaCl <sub>2</sub> | Difenil. |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------------|----------|
| Día 0       | 4,04 Ba  | 4,04 Ba  | 4,04 Ba  | 4,04 Ca  | 4,04 Ba  | 4,04 Ba           | 4,04 Ba  |
| Día 7       | 17,24 Ad | 29,48 Ac | 48,06 Aa | 39,09 Ab | 51,84 Aa | 33,96 Abc         | 70,53 Aa |
| Día 14      | 5,04 Bc  | 5,79 Bbc | 7,83 Bb  | 10,35 Ba | 2,70 Bd  | 2,35 Bd           | 6,23 Bbc |

Figura 4.4. Producción de etileno de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los diferentes días por tratamiento ( $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

Se puede observar como todos los tratamientos mostraron un patrón de emisión de etileno similar en sus frutos a lo largo de los 14 días de conservación en frío. En el día 0 se obtiene una emisión de etileno baja (4,04 nl/gr), experimentando un aumento considerable el día 7 en todos los tratamientos, con diferencias

significativas entre ellos y volviendo a disminuir hasta valores similares a los iniciales para el día 14. Como se puede observar, el tratamiento que mayor producción de etileno desarrolló fue el de difenilamina, seguido del tratamiento de 42°C y acondicionamiento.

El tratamiento control fue el que presentó una menor producción de etileno en el día 7, lo que podría indicar que todos los tratamientos producen un aumento en los niveles emitidos de etileno en sus frutos si se compara con los frutos sin tratar, cuando se devuelven a temperatura ambiente tras 7 días de conservación en frío. Al cabo de 14 días, los valores de emisión de etileno vuelven a bajar a valores cercanos a los del día 0 excepto en el tratamiento 37°C en el que son superiores y en los tratamientos CaCl<sub>2</sub> y 42°C en los que son significativamente inferiores a los obtenidos el día 0 de conservación en frío.

La exposición a temperaturas bajas en calabacín, da lugar inmediatamente a la producción de etileno al pasar de nuevo a temperaturas más elevadas (Field, 1990 citado en Balandrán-Quintana *et al.*, 2003). Megías *et al.* (2012) encontraron el mismo comportamiento, observando que en los frutos recién recolectados la producción de etileno era muy baja, para luego aumentar más de 200 veces tras 7 días de almacenamiento a 4°C; aunque el etileno inducido por frío no parecía estar relacionado con el desencadenamiento de DF, ya que los síntomas eran evidentes algunos días antes de la crecida en la producción de etileno. Sin embargo, los frutos de las variedades que eran más susceptibles a los DF, también fueron aquellos que produjeron más etileno después de este almacenamiento en frío.

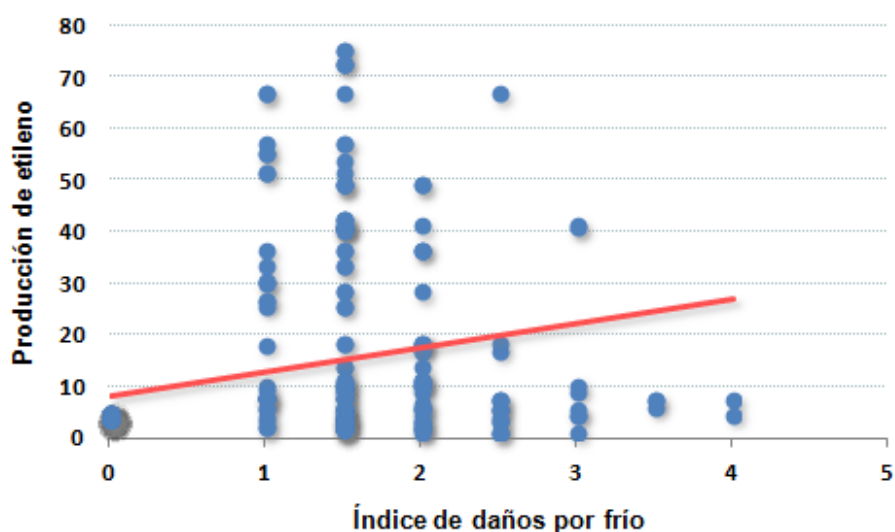
La inducción de etileno que se produce a los 7 días podría deberse a una activación transcripcional de los genes ACS y ACO (Megías *et al.*, 2012), mientras que la disminución de etileno que se produce al día 14 de conservación podría deberse a la pérdida de la integridad de las membranas que acompaña a los daños por frío, lo que afecta a la conversión de ACC en etileno (Field, 1990).

En los resultados de emisión de etileno por frutos de calabacín de este trabajo se observa un comportamiento similar al del ensayo de Megías *et al.*, (2012) anteriormente mencionado ya que, exceptuando el tratamiento control, el tratamiento

de difenilamina, que fue el que más IG de DF presentó, también presenta mayor grado de producción de etileno en comparación con el tratamiento plastificado, que fue el que menor índice de DF presentó, además de ser uno de los tratamientos que menor producción de etileno experimentó, lo que parece indicar que el tratamiento plastificado reduce la producción de etileno más que el resto de tratamientos ensayados.

### Correlación entre la producción de etileno y el índice de daños por frío:

Dado que como se comentó en la revisión bibliográfica, el índice de daños por frío estaría relacionado con la producción de etileno, es interesante conocer la correlación que existe entre ambos parámetros.



Gráfica 4.1. Correlación entre la producción de etileno y el índice de DF de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.

El coeficiente de correlación es igual a 0,25, indicando una relación relativamente débil entre las variables, y el valor-P es menor que 0,05, por lo que

existe una relación estadísticamente significativa entre la producción de etileno y los daños por frío, con un nivel de confianza del 95,0%.

Como se puede observar en la gráfica, existe una relación lineal entre la producción de etileno y el grado de DF, que indica que una mayor cantidad producción de etileno de los frutos de calabacín estudiados en este ensayo, conlleva un mayor grado de DF en los mismos. Esta relación se corresponde con los resultados obtenidos en ensayos realizados por Megías *et al.* (2012), donde se observó que el etileno no es necesario para la activación de los síntomas de daños por frío en calabacín, sin embargo, el nivel de etileno fue menor en los cultivares que eran más tolerantes a la DF, y fue menor también en tratamientos de acondicionamiento de temperatura que alivian los síntomas de DF.

También se corresponden con los resultados del ensayo realizado por Megías *et al.* (2013), donde en calabacines tratados con 1-MCP y almacenados en frío durante 14 días, se observó que el etileno tiene un papel activo en el proceso de desarrollo de los DF en calabacín.

#### **4.4 Efectos de los tratamientos sobre la respiración**

La producción de CO<sub>2</sub>, se midió al inicio del periodo de conservación a 4°C (día 0) y a los 7 y 14 días de conservación. Para ello se colocaron tres frutos de cada tratamiento en botes herméticos durante 6 horas, tomando una muestra del aire del bote para analizar tanto el CO<sub>2</sub> como el O<sub>2</sub> acumulado. Se llevaron a cabo 3 repeticiones por cada tratamiento y tiempo de conservación estudiados. Los datos de producción de CO<sub>2</sub> según los diferentes tratamientos obtenidos se representan en la Figura 4.5.

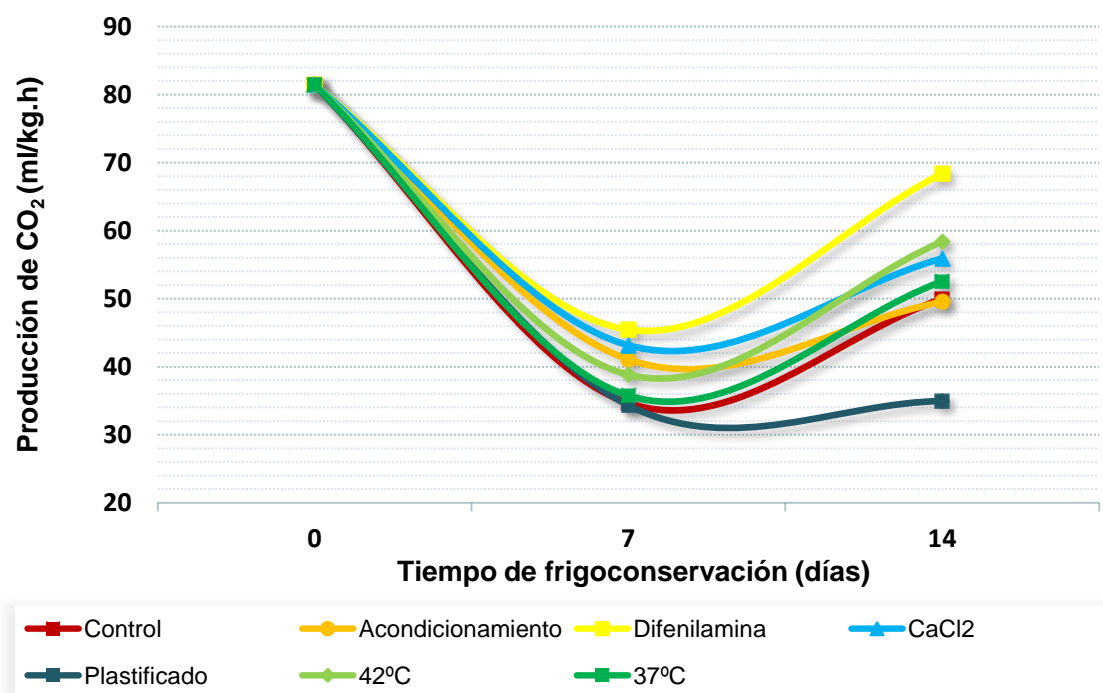


Figura 4.5. Producción de CO<sub>2</sub> de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los diferentes días por tratamiento ( $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

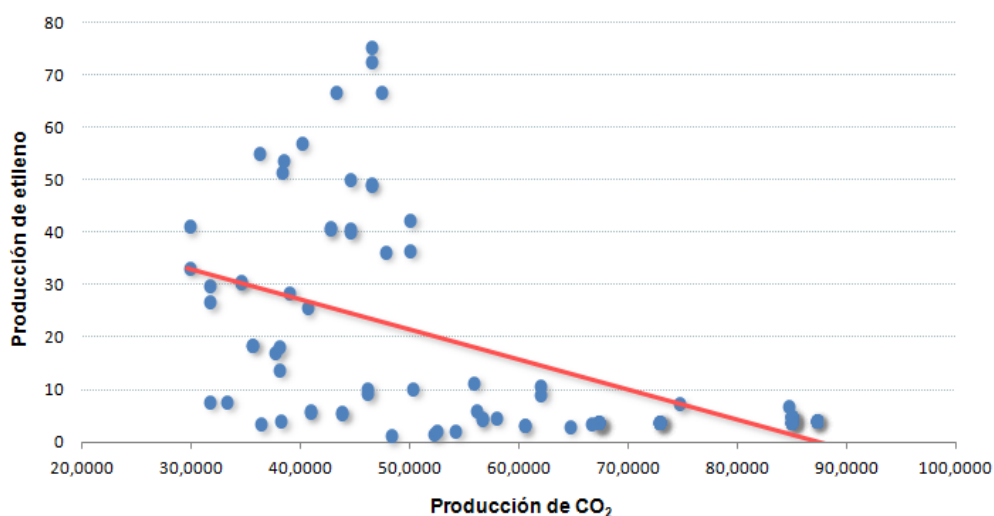
La evolución de la producción de CO<sub>2</sub> sigue una tendencia similar en los frutos de todos los tratamientos estudiados, que parece ser inversa a la que describe la producción de etileno de esos mismos frutos, lo que puede deberse a la influencia del CO<sub>2</sub> sobre la ACC oxidasa, enzima reguladora de la conversión del ACC en etileno (Chavez-Franco y Kader, 1993), haciendo que niveles altos de CO<sub>2</sub> inhiban la producción de etileno y viceversa, entre otros factores.

El día 0 la producción de CO<sub>2</sub> es alta, dada que los frutos están recién cosechados y tienen una alta tasa respiratoria. En el día 7 disminuye la producción de CO<sub>2</sub> presumiblemente por el aumento en la producción de etileno, observándose diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y días.

Al día 14 los niveles de CO<sub>2</sub> producidos por los frutos se vuelven a elevar, especialmente en el tratamiento con difenilamina. Esto puede deberse a que cuando se supera la fase de inducción de los DF, que tiene una duración de aproximadamente 14 días, aparecen los síntomas y su establecimiento es irreversible, provocando la elevación moderada de la temperatura la aceleración del desarrollo de los mismos (Marcellin, 1992; Artés, 1995), aumentando la respiración de los frutos. El único tratamiento en el que no aumentaron los niveles de CO<sub>2</sub> a los 14 días de conservación fue en el plastificado, debido posiblemente a que como apuntan Lyons y Breidenbach (1990), en frutos tolerantes al frío o en frutos sensibles conservados por encima de la temperatura que dispara los daños por frío de manera irreversible, la producción de CO<sub>2</sub> va disminuyendo progresivamente a lo largo de 16 días de conservación; lo que puede indicar que el tratamiento con plastificado de los frutos induce cierta tolerancia de los mismos al frío.

### **Correlación entre la producción de etileno y la producción de CO<sub>2</sub>:**

La relación que existe entre el índice de daños por frío y el nivel de producción de etileno se representa en la siguiente Gráfica 4.2.



**Gráfica 4.2. Correlación entre la producción de etileno y la producción de CO<sub>2</sub> de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.**

El coeficiente de correlación es igual a -0,56, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables, y el valor-P es menor que 0,05, por lo que existe una relación estadísticamente significativa entre la producción de CO<sub>2</sub> y la producción de etileno con un nivel de confianza del 95,0%. Esta relación entre ambos parámetros indica que ha mayor producción de etileno, menor producción de CO<sub>2</sub> de los frutos evaluados en este ensayo.

Esta relación se corresponde con lo dicho anteriormente sobre que altos niveles de CO<sub>2</sub> actúan eficientemente en retardar los mecanismos dependientes de la síntesis de etileno (Beaudry, 1999) y con ensayos como los de Rodov *et al.* (1998) en calabacín y melón conservados 16 días a 10°C, donde con niveles altos de CO<sub>2</sub> (próximos al 10%), se inhibieron los efectos nocivos del etileno acumulado en el interior de los envases, con mejoras en el ablandamiento y prolongando la vida comercial.

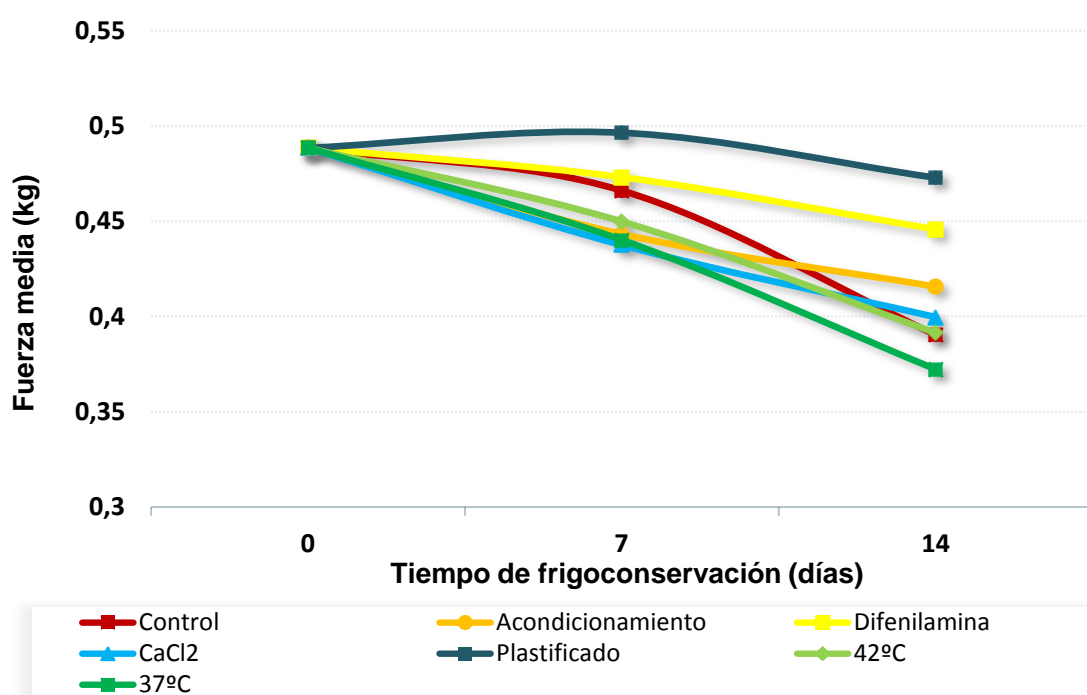
Esta relación también indica que con niveles altos de CO<sub>2</sub>, el índice de DF será menor, lo que se corresponde con los resultados obtenidos por Rodov *et al.*



(1998), donde se observó que niveles altos de CO<sub>2</sub> en pepino durante 14 días a 7°C, redujo el grado de DF.

#### 4.5 Efectos de los tratamientos sobre la firmeza

Los resultados de firmeza obtenidos para los frutos de cada tratamiento y día de conservación de este ensayo fueron los que se muestran en la siguiente Figura 4.6.



| Tratamiento | Control   | Plastif.  | Acondic.  | 37°C      | 42°C       | CaCl <sub>2</sub> | Difenil.  |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------------|-----------|
| Día 0       | 0,488 Aa  | 0,488 ABa | 0,488 Aa  | 0,488 Aa  | 0,488 Aa   | 0,488 Aa          | 0,488 Aa  |
| Día 7       | 0,466 Abc | 0,496 Aa  | 0,443 Bcd | 0,440 Bcd | 0,449 Bbcd | 0,437 Ad          | 0,473 Bab |
| Día 14      | 0,390 Bbc | 0,472 Ba  | 0,415 Cb  | 0,372 Cc  | 0,391 Cbc  | 0,399 Bbc         | 0,445 Ca  |

Figura 4.6. Pérdida de firmeza de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los diferentes días por tratamiento ( $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

Como se puede observar en la Figura anterior, los frutos pierden firmeza conforme avanza el tiempo de conservación en cámara frigorífica, ya que cuanto más tiempo pasa, los frutos pierden más peso y se activan las enzimas que degradan la pared celular, lo que afecta negativamente a la firmeza de los mismos. La pérdida de firmeza parece presentar una correlación con la pérdida de peso, y con la incidencia de los DF.

El tratamiento plastificado fue el que presentó una menor pérdida de firmeza a lo largo del tiempo, con diferencias significativas en comparación con el resto de tratamientos, algo que concuerda con que también es el tratamiento que presentó menores DF, una menor tasa respiratoria y uno de los que menor producción de etileno experimentaron.

El resto de tratamientos excepto el de  $\text{CaCl}_2$  no presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento control en el día 7, aunque sí las presentaron para el día 14 en el caso del tratamiento con difenilamina, posiblemente debido a que algunos frutos con el paso del tiempo se vuelven más elásticos, por lo que la sonda requeriría una mayor fuerza para penetrar en el fruto. También se observó una tendencia positiva en el acondicionamiento, aunque sin diferencias significativas respecto al control.

Los resultados de pérdida de firmeza en plastificado se corresponden con los resultados obtenidos para pepino plastificado por Rajinder (2012), quién evaluó la firmeza de frutos de pepino retractilados o plastificados y conservados a temperatura de  $12^\circ\text{C}$  durante 14 días. A pesar de que los frutos son diferentes, se observa una pérdida de firmeza similar en comparación al tratamiento control en ambos trabajos, lo que parece indicar que el tratamiento de plastificado en frutos no climatéricos e inmaduros fisiológicamente como pepino o calabacín, tiene un efecto positivo en la conservación de la firmeza de los frutos.

#### 4.6 Efectos de los tratamientos sobre el contenido en clorofilas

El contenido en clorofilas se midió de dos formas diferentes; mediante medida indirecta o analítica, con la extracción de la clorofila del exocarpo de los frutos de calabacín, y mediante medida directa de las clorofilas con un clorofilímetro.

- *Determinación del contenido en clorofilas mediante extracción.*

En la determinación indirecta de clorofilas, se calculó el contenido en clorofila a, el contenido en clorofila b, el contenido en clorofilas totales (suma de los dos anteriores) y el contenido en carotenos.

La Figura 4.7 muestra la evolución del contenido de clorofila total en la piel de calabacín durante el periodo de conservación según los diferentes tratamientos aplicados.

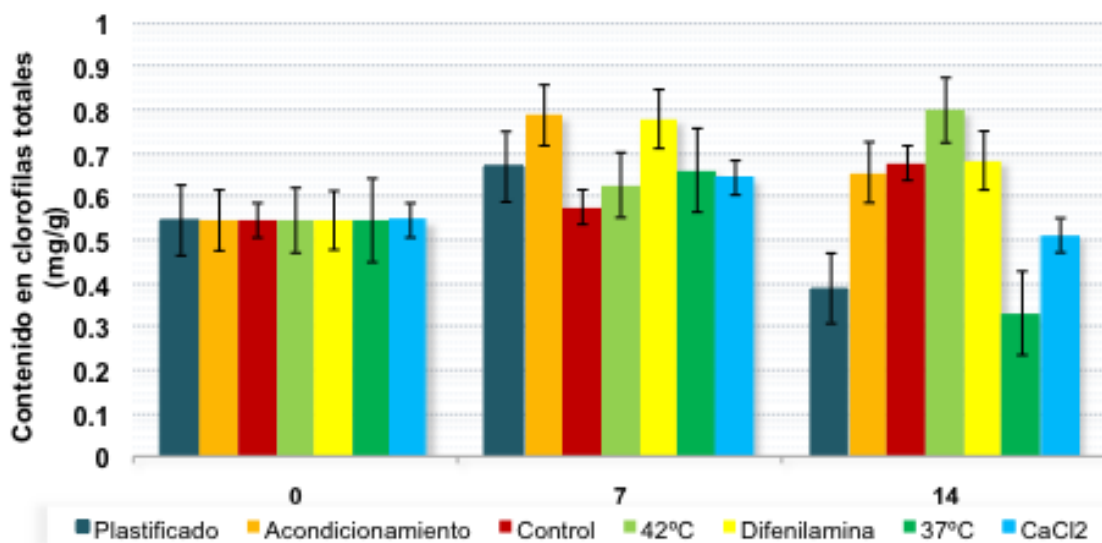


Figura 4.7. Contenido en clorofilas totales de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días por medida indirecta. Las barras de error muestran la desviación típica.

El valor inicial se vio influido por la evolución temporal y los tratamientos encontrándose diferencias entre el control y el resto de los tratamientos en todos los

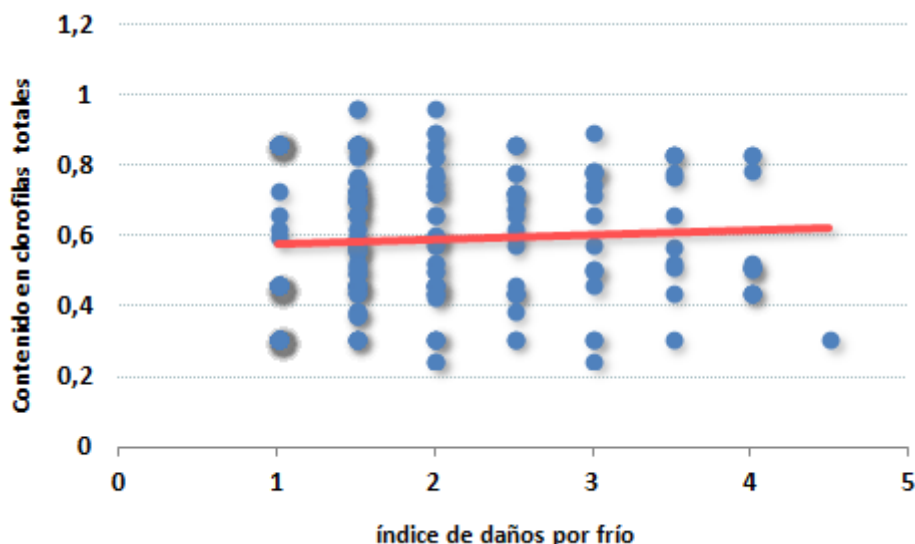
días de conservación. A los 14 días de conservación se observó un ligero incremento en el contenido de clorofila total en todos los tratamientos excepto plastificado, cloruro cálcico y en particular en el tratamiento 37 °C, donde se produjo la mayor reducción en el contenido de clorofilas totales. El resto de los tratamientos produjo un suave incremento en el contenido de clorofilas al finalizar el periodo de conservación.

Los valores obtenidos se corresponden con lo encontrado por otros autores, si bien la variabilidad en el contenido de clorofilas en la piel de calabacín es muy alta, dependiendo no sólo de la variedad sino también se encuentran diferencias durante la vida poscosecha en una misma variedad. Blanco-Díaz et al. (2014), han analizado el contenido en clorofilas en diferentes morfotipos de calabacín y encontraron una gran variabilidad dependiendo del tipo varietal. Los valores encontrados son similares a los encontrados en nuestro ensayo, si bien la técnica de extracción y la expresión de las unidades es diferente, pues mientras Blanco-Díaz et al. (2014) hace referencia a peso seco, nosotros expresamos en peso fresco. Es difícil encontrar en la bibliografía referencias al contenido de clorofila en la piel de calabacín, la mayoría de los estudios realizados hacen referencia o a frutos enteros, o a otro tipo de frutos como pepino. Comparando nuestros resultados con el contenido en clorofilas en pepino, observamos que es unas 10 veces menor (Costache et al., 2012). Esto es lógico dado que la piel de calabacín suele tener un pequeño moteado blanco que, obviamente reduce el contenido en clorofilas.

Es de resaltar que no se han encontrado estudios sobre la evolución del contenido de clorofilas en frutos de calabacín retractorizados. En nuestro tratamiento se encontró una notable reducción del contenido en clorofilas tras los 14 días de conservación. En pepino retractorizado, fruto en el que sí hay más estudios realizados, se ha encontrado una reducción similar a la aparecida en nuestro ensayo. Así, se ha encontrado una reducción en el contenido en clorofilas a, b y total de hasta el 40% en frutos de pepino retractorizado (Sen, 2013), frente a otros métodos de conservación como puede ser el MAP.

### Correlación entre el contenido en clorofilas totales y el grado de daños por frío:

Seguidamente se muestra la relación entre el grado de daños por frío y el contenido en clorofilas totales.



Gráfica 4.3. Correlación entre DF y el contenido en clorofilas de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.

El coeficiente de correlación es igual a 0,078, indicando una relación relativamente débil entre las variables y el valor-P en la tabla ANOVA es mayor o igual a 0,05, por lo que se puede decir que no hay una relación estadísticamente significativa entre el índice de daños por frío y el contenido en clorofilas totales, con un nivel de confianza del 95,0% ó más, lo que indica que el contenido en clorofilas no se ve afectado por el grado de daños por frío que presenten los frutos.

La Figura 4.8 nos muestra la evolución del contenido en carotenoides en función de los tratamientos aplicados y según el tiempo de conservación, los valores obtenidos son similares a los obtenidos por otros autores, aunque pueden diferir debido a las diferentes técnicas de extracción y cuantificación (Blanco-Díaz *et al.* 2013; Muntean *et al.*, 2006).

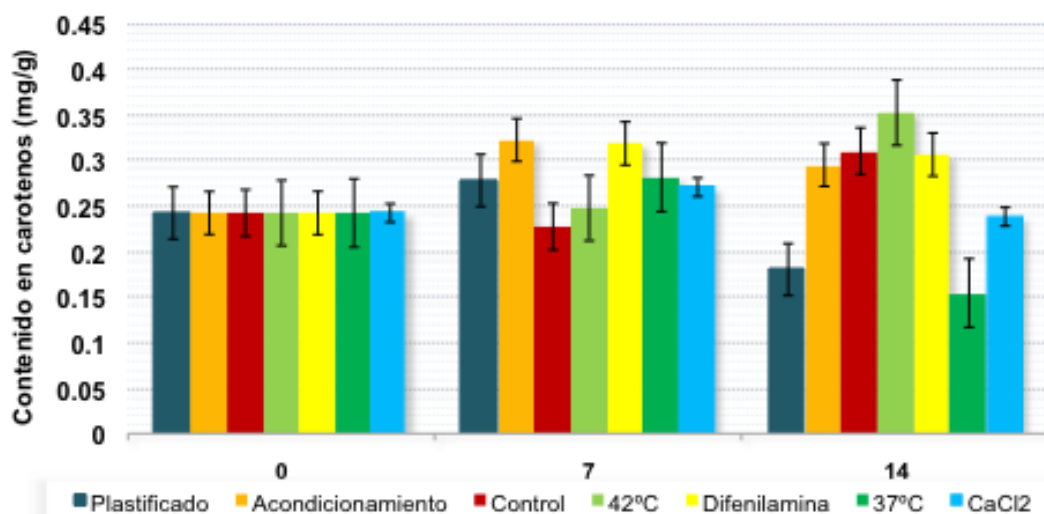
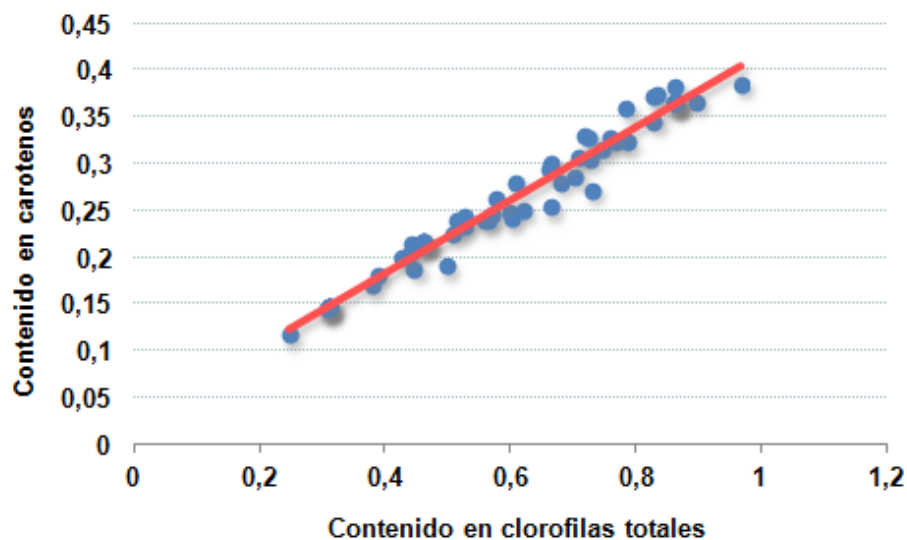


Figura 4.8. Contenido en carotenos de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días por medida indirecta. Las barras de error muestran la desviación típica.

En los carotenoides también se encontraron resultados similares a los comentados anteriormente para las clorofilas. Así por ejemplo, se encontró también un notable descenso en el contenido en carotenoides en los frutos retractorizados tras 14 días de conservación. Todo parece indicar que, como hemos comentado anteriormente para el caso del contenido en clorofilas también ocurre para el contenido en carotenoides, que se ve muy influenciado por los diferentes tratamientos aplicados.

#### **Correlación entre el contenido en clorofilas totales y el contenido en carotenos:**

La relación entre ambos parámetros se representa en la Gráfica 4.4.



**Gráfica 4.4. Correlación entre el contenido en clorofilas y el contenido en carotenos de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.**

El coeficiente de correlación es igual a 0,98, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables y el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, por lo que se puede decir que existe una relación estadísticamente significativa entre el contenido en clorofilas y el contenido en carotenos con un nivel de confianza del 95,0%, lo que se corresponde con lo comentado anteriormente.

- *Determinación del contenido en clorofilas mediante clorofilímetro.*

La determinación del contenido en clorofilas requiere de una extracción con solventes orgánicos y su posterior cuantificación por diversas técnicas. El empleo de un clorofilímetro es una medida fácil, rápida y que para el caso de hojas, es extrapolable al contenido en clorofilas obtenido por técnicas químicas (Cassol *et al.*, 2008). Se creyó de interés evaluar el contenido de clorofilas con el clorofilímetro en la piel de los frutos ensayados.

En la medida con clorofilímetro, las lecturas del instrumento no son valores de clorofila absolutos, sino que cada lectura es un índice de concentración de clorofila por unidad de superficie (ICC; que va de 0 a 99.9).

La Figura 4.9 nos muestra los valores del clorofilímetro en función de los distintos tratamientos aplicados.

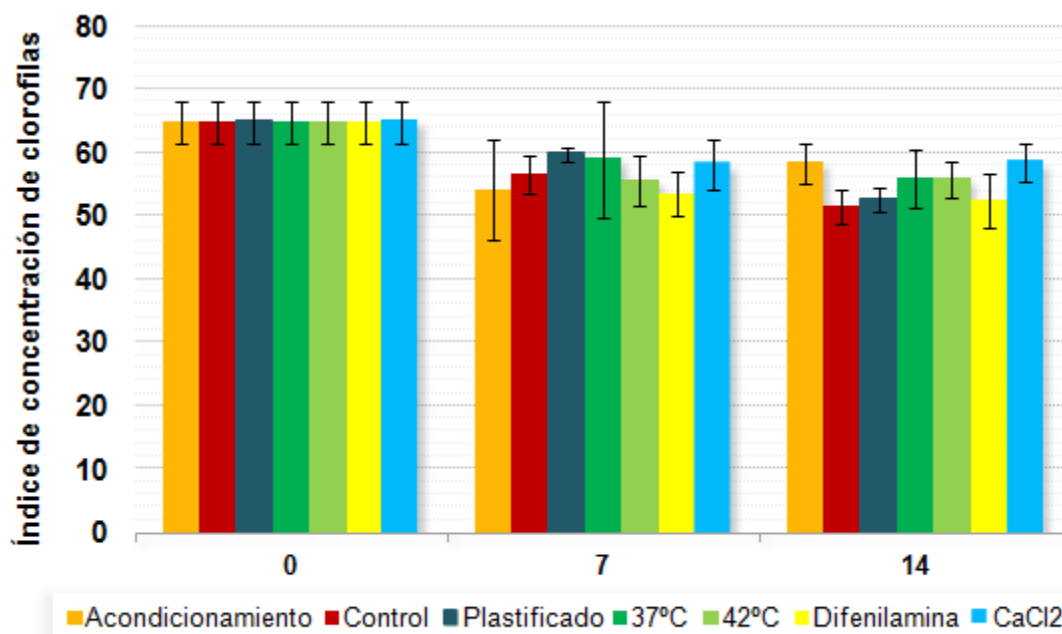


Figura 4.9. Contenido en clorofila de los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días por medida directa. Las barras de error muestran la desviación típica.

No se observaron diferencias entre los distintos tratamientos, aparecieron lógicas fluctuaciones pero en general el clorofilímetro no fue capaz de detectar las diferencias en el contenido de clorofilas cuando se aplicaron distintos tratamientos. Como se observa en la figura anterior, los resultados nos muestran que en la primera semana de conservación, en general se obtuvo un descenso importante en el contenido de clorofila según los resultados del clorofilímetro, manteniéndose constante a partir de los 7 días de conservación.

La comparación de los datos del clorofilímetro con los datos del contenido en clorofilas obtenido mediante extracción química, nos muestra algunas contradicciones. Dado que no se han encontrado estudios en los que se utilice un clorofilímetro para determinar el contenido de clorofilas en la piel de frutos, hemos de

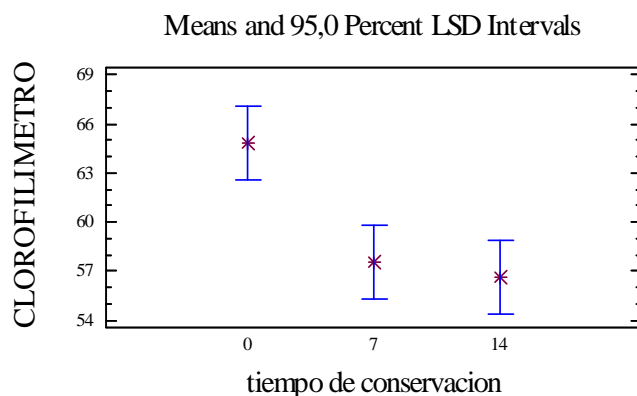


comparar los resultados con aquellos estudios realizados en hoja. Así en primer lugar hay que tener en cuenta que el valor del clorofilímetro es un valor relativo y se emplean como un indicador para efectuar correcciones de abonado, especialmente abonado nitrogenado, dada la relación entre el contenido de clorofila y la deficiencia de nitrógeno (Hawkins *et al.*, 2007), si bien el empleo de estas estimaciones no siempre ha resultado exitosa, pues depende del tipo de cultivo, de las condiciones del mismo, las especies en concreto y de la situación de estrés a las que se vea sometida la planta (Uddling *et al.*, 2007), por tanto a pesar de ser un método controvertido es muy utilizado dado la facilidad de uso e inmediatez de resultados.

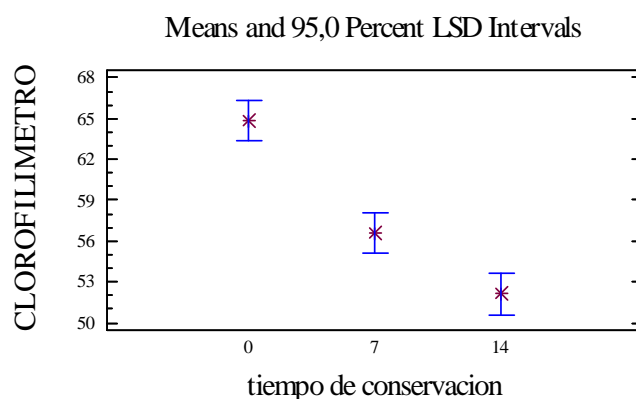
En el caso de los frutos, como se ha comentado anteriormente, no hay datos del uso del clorofilímetro por lo que la discusión hemos de basarla por comparación con datos foliares. En principio los resultados obtenidos están dentro del orden de los obtenidos para hoja por Bacarin *et al.* (2011). Si bien en nuestro caso no se encontraron buenos coeficientes de correlación entre los datos ofrecidos por el clorofilímetro y el contenido en clorofilas determinado espectrofotométricamente. El no encontrar una correlación buena es algo bastante habitual incluso en los estudios foliares y a pesar de que la mayoría de la bibliografía emplea una regresión lineal (Cate y Perkins, 2003; Madeira *et al.*, 2003) muchos estudios indican que a veces hay una relación no lineal entre el contenido de clorofilas y el valor del clorofilímetro (Richardson *et al.*, 2002; Uddling *et al.*, 2007). Esto puede ser explicado por las características anatómicas de las hojas e incluso por el modelos de la distribución heterogénea de la clorofila en las hojas, que puede interferir con las propiedades de absorción y reflexión de la radiación utilizada por el clorofilímetro (Cassol, *et al.*, 2008), ya que es conocido que no hay una distribución uniforme de las moléculas de clorofila dentro de la hoja y que además ésta es influenciada por la organización estructural de los granas en el cloroplasto, la cantidad de clorofila presente en cada célula y la cantidad de células en el tejido fotosintético. Estos modelos varían enormemente entre especies (Fukshansky *et al.*, 1993). Todas estas circunstancias hacen que sea difícil encontrar una relación entre el contenido de clorofilas y el valor del clorofilímetro, pero no anulan la efectividad del mismo como un indicador del contenido de clorofilas (Wang *et al.*, 2004; Bacarin *et al.*, 2011).

En el caso de los frutos, lógicamente hemos de encontrar las mismas limitaciones que en los estudios foliares e, incluso incrementadas ya que los carpelos son hojas modificadas cuyo objetivo no es netamente fotosintético. Además en el caso del calabacín presentan moteados y diversas coloraciones según los cultivares.

No obstante, estas limitaciones no impiden que podamos utilizar el clorofilímetro como un estimador de la evolución de los pigmentos de la piel del fruto y observar cómo evolucionan estos durante la poscosecha y en función de los tratamientos aplicados. En general se observó un descenso durante la primera semana de conservación, la disminución era variable en función del tratamiento aplicado. Tras dos semanas de conservación en sólo dos tratamientos y control, mostraron que su contenido de clorofilas disminuyó mientras que en el resto de tratamientos el valor del clorofilímetro se mantuvo más o menos constante. Para no ser repetitivos, se representarán los dos tipos de comportamiento encontrados que quedan recogidos en las Gráficas 4.5 y 4.6.



**Gráfica 4.5. Análisis multifactorial del comportamiento en los tratamientos baño 37°C, baño 42°C, CaCl<sub>2</sub> y Acondicionamiento.**



**Gráfica 4.6. Análisis multifactorial del comportamiento en los tratamientos retractorilado y difenilamina.**

Los tratamientos baño a 37°C, baño a 42°C, CaCl<sub>2</sub> y Acondicionamiento no presentaron diferencias entre los días 7 y 14 de conservación, lo que puede indicar que las clorofilas se mantuvieron más o menos estables y que estos tratamientos las preservaron (Gráfica 4.5). Por el contrario el control y los tratamientos DF y retractorilado, presentaron un descenso paulatino del valor mostrado por el clorofilímetro, lo que podría indicar que estos tratamientos no preservaron la clorofila en la misma medida que los otros tratamientos (Gráfica 4.6).

Como quiera que en el caso del calabacín, los pigmentos de la piel sólo tienen, desde el punto de vista comercial, un aspecto estético y de coloración, el comportamiento del control indica que a medida que transcurre el tiempo de conservación la cantidad de clorofilas disminuye y lo mismo ocurre en los frutos retractorilados y en los tratados con Difenilamina, un compuesto que actúa como antioxidante al parecer por secuestrar las especies reactivas de oxígeno aunque no está completamente dilucidado su funcionamiento (Purvis, 2002). Por tanto es posible que en calabacín no tenga su aplicación interés alguno, ya que depende mucho del tipo de fruto y de la especie vegetal para que haya un efecto positivo tanto en los daños por frío como en el mantenimiento de la eficiencia fotosintética del tejido verde de los frutos (Purvis, 2002). De la misma manera el retractorilado no favorece el mantenimiento de la clorofila, pero quizá los otros efectos positivos,

como es la reducción del daño por frío y la reducción de la pérdida de peso compensan y hace atractivo su uso como método de conservación.

En el resto de tratamientos se observó que en la segunda semana de conservación el valor del clorofilímetro se mantuvo constante (Gráfica 4.5) lo que podría ser efectivo en el mantenimiento del color del fruto ya que el contenido de clorofila es un factor más que interviene en el color.

#### **4.7 Efectos de los tratamientos sobre el estrés oxidativo**

Para estudiar los efectos de los diferentes tratamientos sobre el estrés oxidativo se han utilizado muestras biológicas de las variedades *Sinatra* y *Natura*. El motivo de utilizar estas dos variedades para éste parámetro es que comparada con estas dos variedades ensayadas en trabajos del grupo de Genética y Fisiología Vegetal de la Universidad de Almería en los parámetros de calidad poscosecha anteriormente estudiados (pérdida de peso, producción de etileno, tasa respiratoria, firmeza y daños por frío), la variedad *Victoria* ha tenido un comportamiento intermedio entre ambas, siendo *Natura* menos susceptible a DF y siendo *Sinatra* más sensible a DF, considerándose más interesante estudiar estas dos variedades con comportamientos extremos.

Asimismo, este parámetro de estrés oxidativo se ha estudiado en los tratamientos *Control*, *Acondicionamiento* y *Plastificado*, ya que como se puede observar en los apartados anteriores, son los tratamientos que mejor comportamiento han presentado en cuanto a pérdida de peso, producción de etileno, tasa respiratoria, firmeza y DF.

Se han utilizado muestras de exocarpo de tres calabacines de cada tratamiento y variedad, con tres repeticiones de cada una, conservadas a -80°C. Las muestras se congelaron a esa temperatura con nitrógeno líquido en el mismo momento en el que se estudiaron el resto de parámetros anteriormente vistos, es decir, 6 horas después de haber estado almacenados a 4°C. Al estar conservadas a -80°C, se asegura que se paralicen de forma súbita las reacciones que se pudieran

estar desarrollando en el material biológico en el momento exacto de su congelación, y así poder estudiar el estrés oxidativo en las mismas condiciones en que se estudiaron el resto de parámetros de este trabajo.

#### 4.7.1 Efectos en el contenido en peróxido de hidrógeno.

- Contenido en  $H_2O_2$  obtenido en la variedad *Sinatra*:

Las cantidades de peróxido de hidrógeno obtenidas en el ensayo para ésta variedad se presentan gráficamente a continuación.

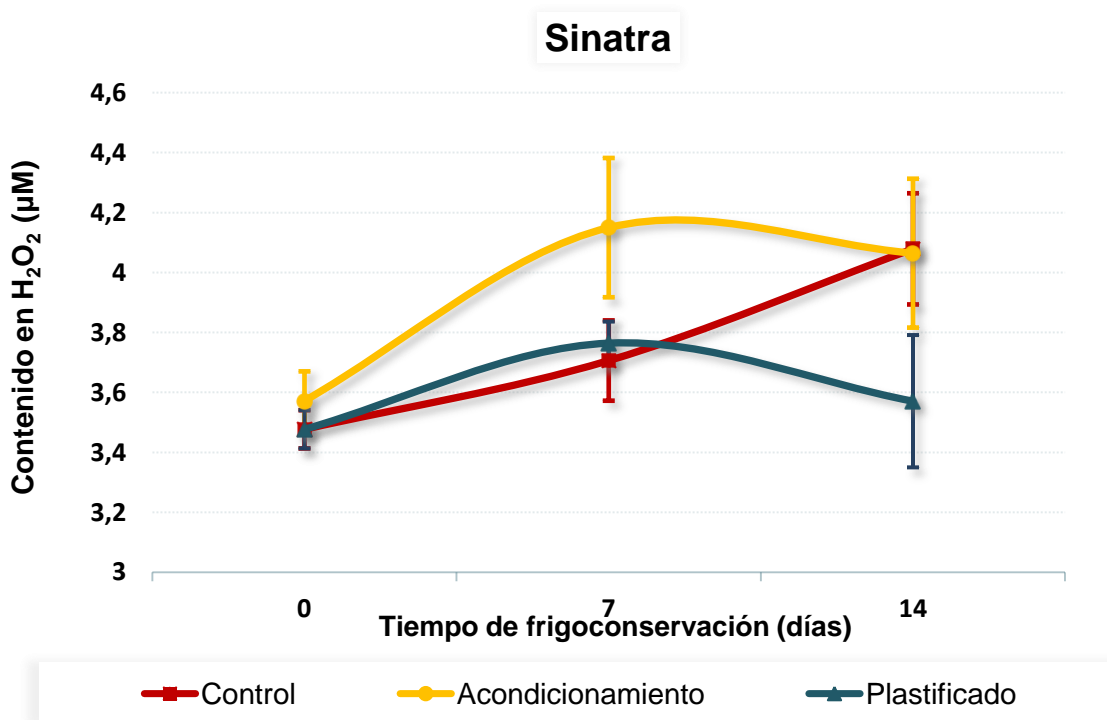


Figura 4.10. Contenido en  $H_2O_2$  de los frutos de la variedad *Sinatra* conservados a  $4^{\circ}C$  durante los 0, 7 y 14 días. Las barras de error muestran la desviación típica.

Se observan una tendencia creciente del contenido en  $H_2O_2$  en los tres tratamientos hasta el día 7, cuando los frutos de los tratamientos acondicionamiento

y plastificado disminuyen su contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que el control lo aumenta, con algunas diferencias significativas entre los tres tratamientos. El día 0 el tratamiento de acondicionamiento presenta un contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> algo mayor que el resto de tratamientos aunque sin diferencias significativas, no observándose tampoco diferencias entre el tratamiento control y el plastificado.

El día 7 de conservación a 4°C, el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentó en todos los tratamientos, de forma más acentuada en el tratamiento de acondicionamiento. Entre el tratamiento control y el tratamiento plastificado no se observaron diferencias significativas.

En el día 14, el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyó en el tratamiento plastificado, mientras que en los otros dos tratamientos se mantuvo en niveles parecidos a los del día 7. No se observaron diferencias significativas entre el control y el acondicionamiento para el día 14, pero si se presentaron diferencias significativas en el plastificado respecto a los otros dos tratamientos.

El comportamiento de la variedad *Sinatra* para el contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tratamiento control de este ensayo se corresponde con el comportamiento de la misma variedad en ensayos realizados por Carvajal *et al.*, (2011). En ese ensayo se estudiaron diferentes variedades de calabacín (sin ningún tipo de tratamiento) almacenadas a 4°C durante 14 días de la misma forma que se hizo en este trabajo. Para la variedad *Sinatra* se obtuvieron valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> algo superiores a los obtenidos en este ensayo (valores superiores a 4 µM para el día 0 y superiores a 7µM para los días 7 y 14) pero con una tendencia de desarrollo creciente similar.

La reducción del contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observada en el tratamiento plastificado, parece indicar que este tratamiento ejerce un efecto positivo reduciendo el grado de estrés oxidativo.

- Contenido en  $H_2O_2$  obtenido en la variedad *Natura*:

Los resultados obtenidos de contenido en  $H_2O_2$  para esta variedad en este ensayo fueron los que se presentan a continuación.

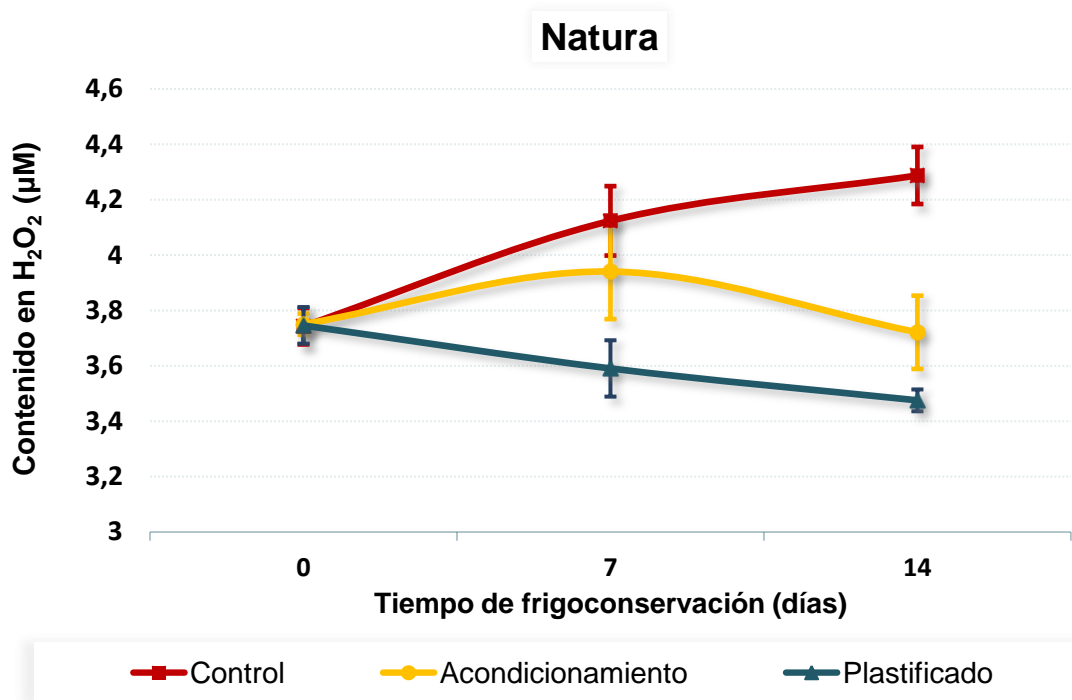


Figura 4.11. Contenido en  $H_2O_2$  de los frutos de la variedad *Natura* conservados a  $4^{\circ}C$  durante los 0, 7 y 14 días. Las barras de error indican desviaciones típicas.

Los patrones de desarrollo que muestran cada uno de los tratamientos para la variedad *Natura* son diferentes. En el día inicial, los tres tratamientos tienen contenidos de  $H_2O_2$  similares, no existiendo diferencias significativas entre ellos.

En el día 7 de frigo conservación, los tratamientos control y acondicionamiento aumentan el contenido en  $H_2O_2$  sin diferencias significativas entre ellos, experimentando el tratamiento control un contenido en  $H_2O_2$  mayor que el tratamiento acondicionamiento. Por el contrario, el tratamiento plastificado disminuyó su contenido en  $H_2O_2$  respecto al día 0, presentando diferencias significativas en comparación con los otros dos tratamientos ensayados.

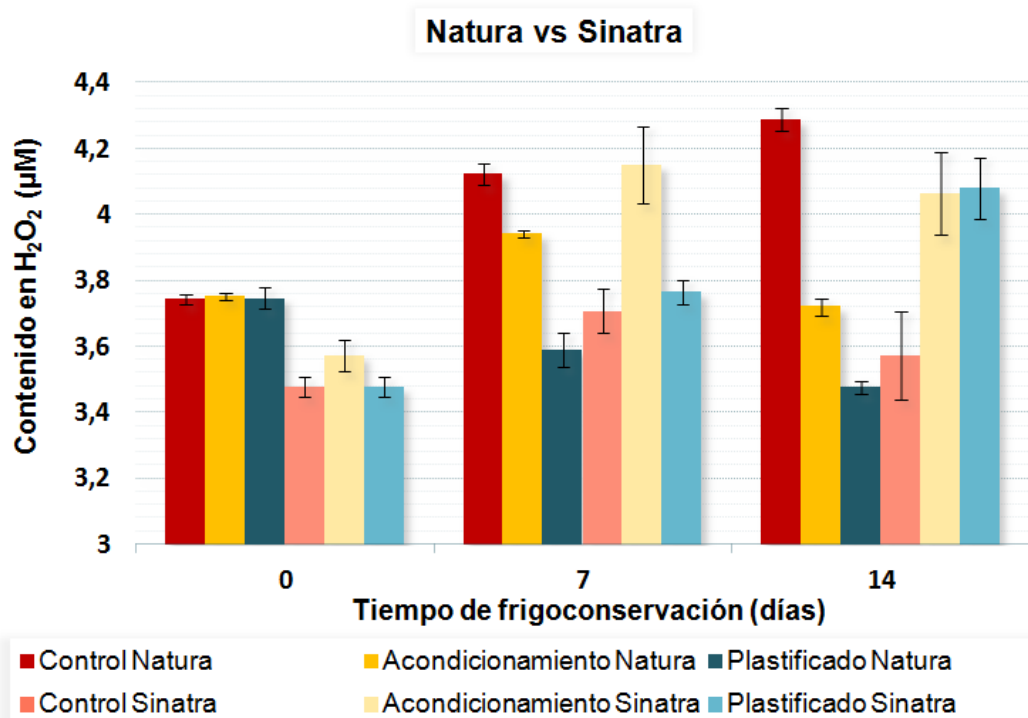
El día 14 el tratamiento control aumentó su contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta los 4,28 µM presentando diferencias significativas respecto a los otros dos tratamientos. El tratamiento de acondicionamiento disminuyó su contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta los 3,72 µM alcanzando un valor similar al del día 0 y presentando diferencias significativas respecto al tratamiento control y plastificado. El tratamiento plastificado también disminuyó su contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta los 3,47 µM, muy por debajo de su valor inicial y del resto de tratamientos, presentando diferencias significativas respecto a ellos.

Este comportamiento no se corresponde con el obtenido por Carvajal *et al.* (2011), donde para la variedad *Natura* almacenada a 4°C durante 14 días, el contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajó en el día 7 y aumentó hasta valores similares a los del día 0 (entorno a 2,5 µM para los días inicial y final y alrededor de 0,5 µM para el día 7); pero es destacable que los frutos tratados con alguno de los dos tratamientos (acondicionamiento y plastificado) en este trabajo reduzcan sus contenidos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma significativa ya que existe una relación positiva entre los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los daños por frío, lo que hace de este parámetro un buen indicador del daño por frío (Carvajal *et al.*, 2011). Lo que parece indicar que estos dos tratamientos tienen un efecto positivo en la reducción del estrés oxidativo en los frutos de *Natura*.

#### **4.7.1.1 Comparación del contenido en peróxido de hidrógeno entre variedades**

Si comparamos las dos variedades para cada uno de los tratamientos, podemos observar que para el tratamiento control, en la variedad *Natura* los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> crecen a lo largo de los 14 días de almacenamiento de forma superior a la variedad *Sinatra*. Para el tratamiento de acondicionamiento en las dos variedades los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> crecen el día 7 respecto al día 0, y decrecen el día 14, pero en *Sinatra* los niveles son más altos que en *Natura*, excepto para el día 0. En el tratamiento plastificado, la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye en los frutos de *Natura* a lo largo del tiempo, mientras que en los de *Sinatra* aumenta. Por lo que se puede deducir que la variedad *Natura* responde mejor a los tratamientos que la variedad



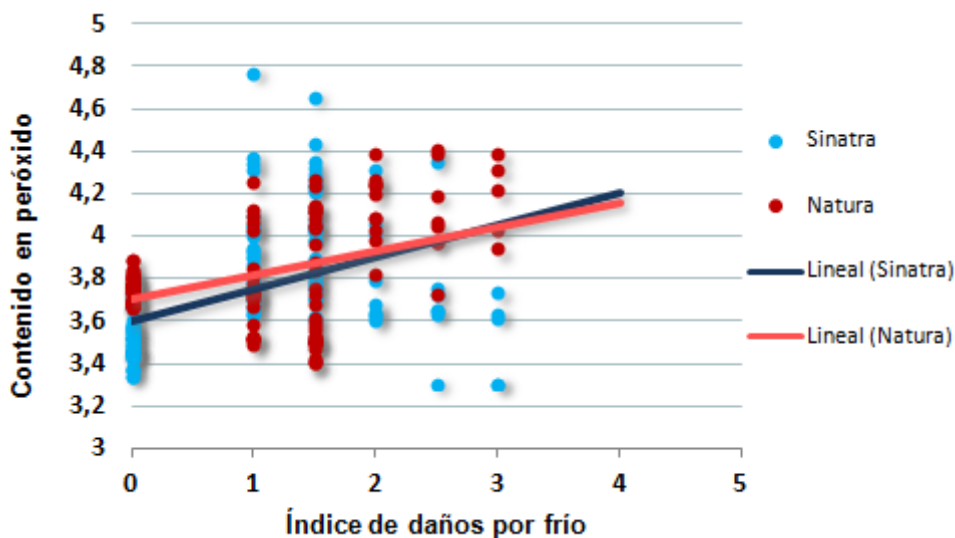


*Sinatra* (sobre todo al tratamiento plastificado) al reducir su contenido en  $H_2O_2$ , reduciendo por consiguiente el grado de estrés oxidativo y los efectos de la senescencia.

Figura 4.12. Comparación del contenido en  $H_2O_2$  de los frutos de las variedades *Natura* y *Sinatra* a los 0, 7 y 14 días. Las barras de error indican desviaciones típicas.

### Correlación la cantidad de $H_2O_2$ y el índice de daños por frío:

Es interesante conocer la relación que existe entre el índice de daños por frío y el contenido en  $H_2O_2$  del material vegetal estudiado en este ensayo. Para ello, se ha realizado la correlación múltiple que aparece en la Gráfica 4.7.



Gráfica 4.7. Correlación entre el índice de DF y la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.

El estadístico  $R^2$ , que es más apropiada para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 39,59%. El valor-P es menor que 0,05, por lo que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0%. Como puede observarse en la gráfica, la relación entre ambos parámetros indica que un mayor índice de daños por frío se corresponde con un mayor contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los frutos estudiados en las condiciones de este ensayo. Lo que se corresponde con lo dicho anteriormente en la revisión bibliográfica por Sevillano *et al.* (2009) y con los resultados obtenidos en trabajos como los de Carvajal *et al.* (2011).

#### 4.7.2 Efectos en el contenido en malondialdehído.

- *Contenido en MDA en la variedad Sinatra.*

Los resultados obtenidos para el contenido en MDA son los que se muestran a continuación.

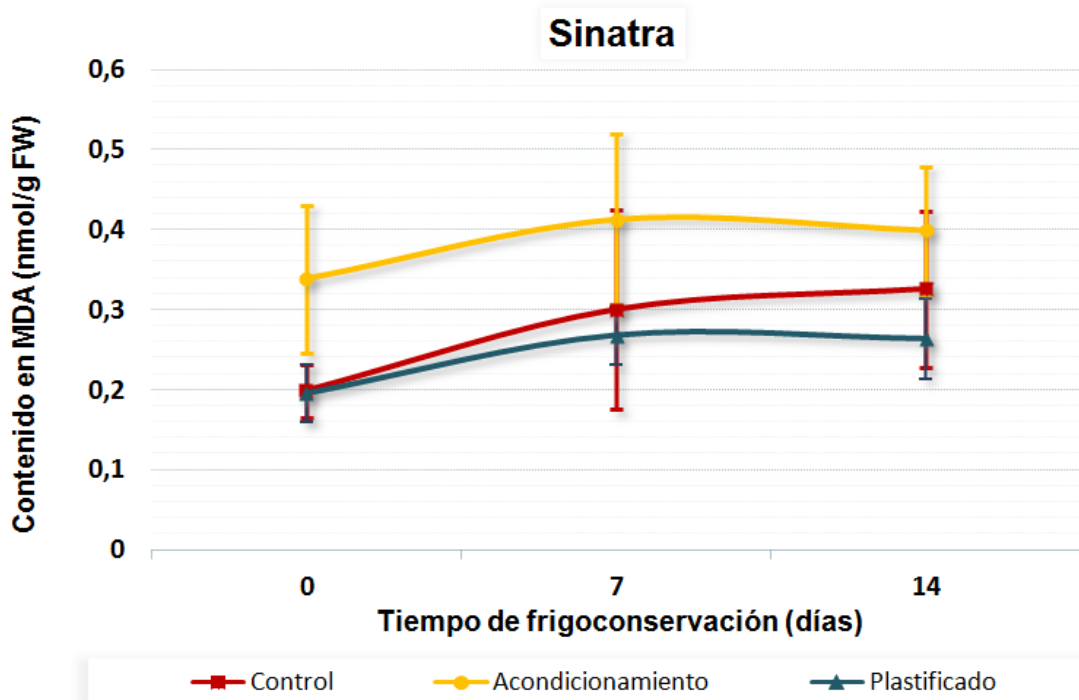


Figura 4.13. Contenido en MDA de los frutos de la variedad *Sinatra* conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días. Las barras de error indican desviaciones típicas.

En el contenido en MDA de la variedad *Sinatra* se observa una tendencia similar en todos los tratamientos. En el día 0 se obtienen las cantidades más bajas, algo normal al tratarse de frutos recién cosechados. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos control y plastificado, pero el tratamiento acondicionamiento presenta unas cantidades de MDA algo superiores a estos dos tratamientos con diferencia significativa.

En el día 7 todos los tratamientos aumentan las cantidades de MDA, debido a la senescencia creciente de los frutos, indicando un aumento del estrés oxidativo, no presentándose diferencias significativas entre tratamientos.

El día 14 el tratamiento control aumenta su contenido en MDA, mientras que los demás tratamientos lo disminuyen, sin observarse diferencias significativas entre ellos.

Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Carvajal *et al.* (2011), donde un tratamiento similar al control de este trabajo en *Sinatra* conservado a 4°C durante 14 días, aumenta su contenido en MDA durante el periodo de conservación en frío, aunque a niveles superiores a los de este ensayo.

El tratamiento plastificado, aunque no presenta diferencias significativas respecto al control, muestra una tendencia a disminuir el contenido en MDA, indicando un posible efecto positivo en cuanto a la reducción de nivel de estrés oxidativo, que se corresponde con un nivel inferior de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de este mismo tratamiento y a su vez con un menor grado de DF y senescencia en general de los frutos.

- *Contenido en MDA en la variedad Natura:*

El contenido de MDA obtenido en los frutos de esta variedad de calabacín se representa en la Figura 4.14.

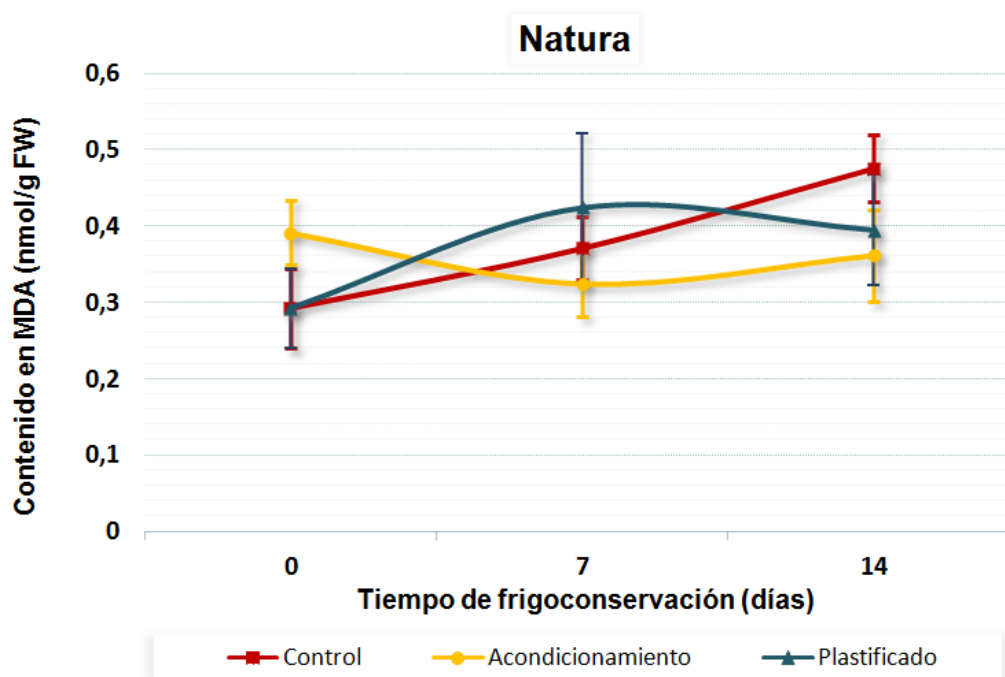


Figura 4.14. Contenido en MDA de los frutos de la variedad *Natura* conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días. Las barras de error indican desviaciones típicas.

Como se observa en la gráfica, la tendencia los tratamientos es a aumentar su contenido en MDA a lo largo del tiempo, algo evidente al aumentar la senescencia de los frutos, y por tanto el estrés oxidativo a lo largo del tiempo.

El día 0 se presentan los niveles de MDA más bajos, debido a que los frutos acaban de ser recolectados. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos control y plastificado, pero se observa una diferencia significativa del tratamiento acondicionado respecto a ambos, presentando uno niveles de MDA algo superiores a los del resto de tratamientos.

Los resultados obtenidos en el día 7, indican un incremento del contenido en MDA en los tratamientos control y plastificado, y aunque el tratamiento de acondicionamiento experimenta una reducción del nivel de MDA, no se observa ninguna diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

En el día 14 la cantidad de MDA aumenta en el tratamiento control, por efecto de la degradación creciente que sufren los frutos a lo largo de su almacenamiento. Los tratamientos plastificado y acondicionamiento, aunque no presentan diferencias significativas entre sí, ni respecto al control, experimentan una tendencia a disminuir su contenido en MDA, pudiendo indicar un efecto positivo de estos tratamientos en la reducción del estrés oxidativo de los frutos.

Aunque la tendencia de los frutos es aumentar su contenido en MDA, ya que el estrés oxidativo aumenta con el tiempo, estos resultados no se corresponden con los obtenidos por Carvajal *et al.* (2011), donde para un tratamiento similar al control de este trabajo en la variedad *Natura* conservados a 4°C durante 14 días, se obtienen niveles decrecientes de MDA a lo largo del tiempo de almacenamiento, siendo esos niveles considerablemente más altos a los obtenidos en este ensayo.

#### **4.7.2.1 Comparación del contenido en malondialdehído entre variedades**

Si comparamos las dos variedades para cada uno de los tratamientos, podemos observar que para el tratamiento control, en la variedad *Natura* los niveles

de MDA crecen a lo largo de los 14 días de almacenamiento de forma superior a la variedad *Sinatra* con diferencias significativas los días inicial y final del almacenamiento en frío. Para el tratamiento de acondicionamiento en la variedad *Sinatra* los niveles de MDA crecen el día 7 respecto al día 0, y decrecen el día 14, aunque sin diferencias significativas, pero en *Natura* decrecen el día 7 respecto al día 0 y crecen levemente el día 14, aunque sin diferencias significativas. En el tratamiento plastificado, la cantidad de MDA aumenta en los frutos de *Natura* y de *Sinatra* a lo largo del tiempo, pero sin diferencias significativas. En general, no hay diferencias significativas entre tratamientos para el contenido de MDA, observándose en la variedad *Natura* unas cantidades de MDA superiores a las encontradas en la variedad *Sinatra*, algo que no se corresponde con los resultados obtenidos por Carvajal *et al.* (2011), donde la variedad *Natura* presentó niveles de MDA menores a los observados en la variedad *Sinatra*.

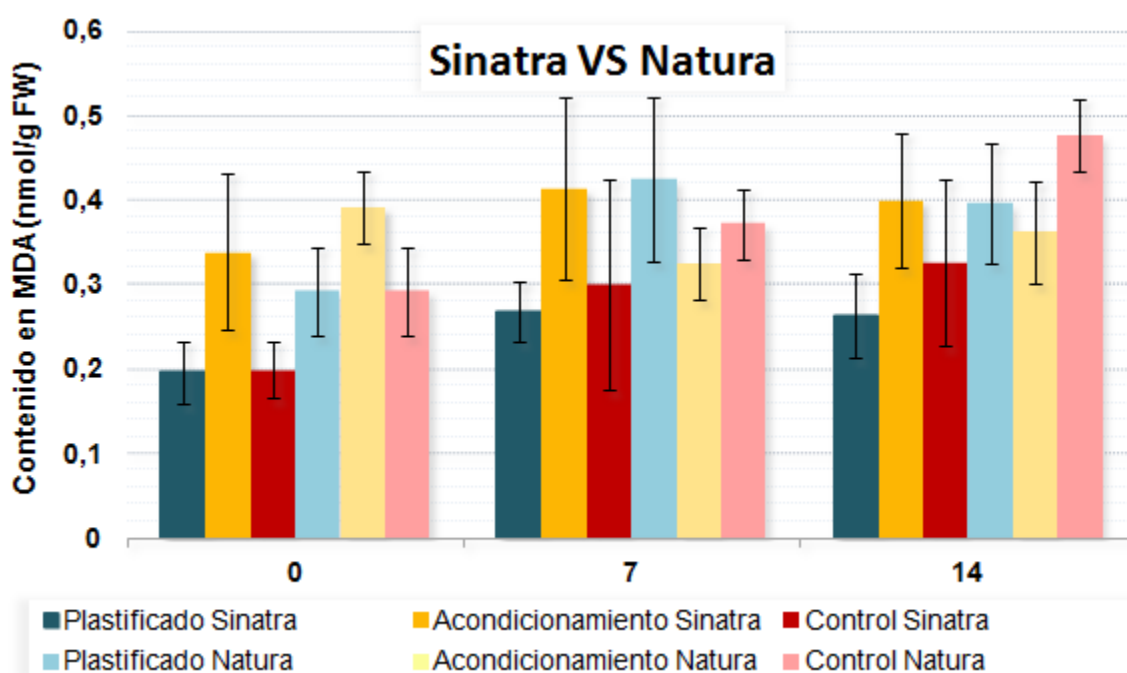
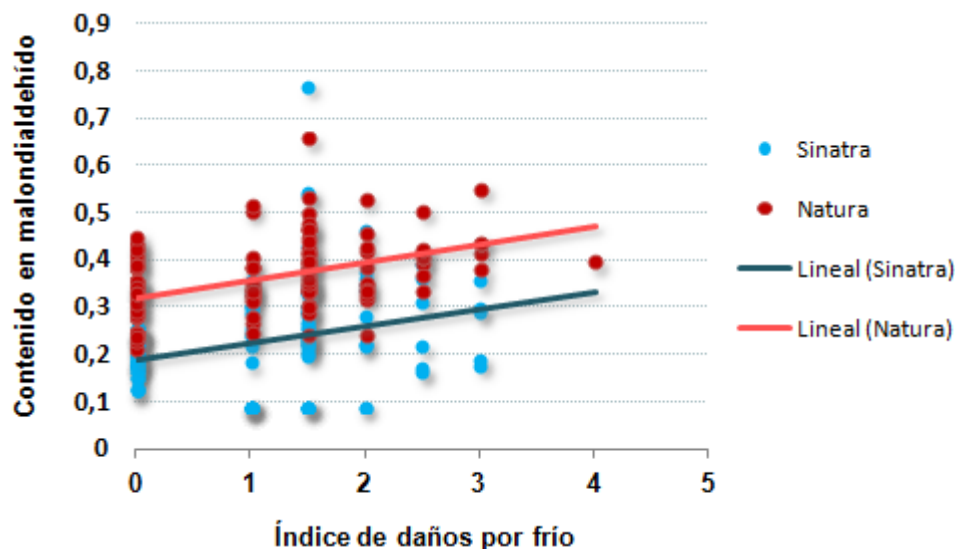


Figura 4.15. Comparación del contenido en MDA de los frutos de las variedades *Natura* y *Sinatra* a los 0, 7 y 14 días. Las barras de error indican desviaciones típicas.

### Correlación entre la cantidad de MDA y el índice de daños por frío:

Dado que la cantidad de MDA es un indicador del grado de estrés oxidativo del material vegetal, es interesante conocer la relación que existe entre el índice de daños por frío y el contenido en  $H_2O_2$  del material vegetal estudiado en este ensayo. Para ello, se ha realizado la correlación múltiple que aparece en la Gráfica 4.8.



Gráfica 4.8. Correlación entre el índice de DF y la cantidad de MDA en los frutos conservados a 4°C durante los 0, 7 y 14 días.

El estadístico  $R^2$ , que es más apropiada para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 25,33%. El valor-P es menor que 0,05 existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0%.

Como puede observarse en la gráfica, la relación entre ambos parámetros indica que un mayor índice de daños por frío se corresponde con un mayor contenido en MDA en los frutos estudiados en las condiciones de este ensayo. Lo que se corresponde con lo dicho anteriormente en la revisión bibliográfica por Sevillano *et al.* (2009) y con los resultados obtenidos en trabajos como los de

Carvajal *et al.* (2011). Además esto también indica que hay una correlación entre las cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de MDA obtenidas en los frutos, y a su vez con el índice de DF en las condiciones de este ensayo.



# 5 | Conclusiones

## 5. CONCLUSIONES

PRIMERA: Los tratamientos que mejoraron la tolerancia a la frigoconservación de los frutos y muestran un menor nivel de daños por frío en el tiempo y en las condiciones de este ensayo, fueron los de *Plastificado*, *Acondicionamiento* y *baño a 42°C*.

SEGUNDA: Los tratamientos de *Plastificado* y *Acondicionamiento* redujeron en mayor grado la pérdida de peso de los frutos, lo que se tradujo en una menor pérdida de firmeza, sobretodo en el caso del tratamiento *Plastificado*.

TERCERA: En general, el tratamiento de los frutos aumenta su producción de etileno, sobre todo el séptimo día de friconservación y su tasa respiratoria, excepto en el *Plastificado*, donde la tasa respiratoria se reduce a lo largo del tiempo de conservación y la producción de etileno es menor que en el resto de tratamientos.

CUARTA: El tratamiento de *Acondicionamiento* reduce la cantidad de peróxido de hidrógeno en la variedad *Natura*, lo que indica que un acondicionamiento de los frutos reduce el estrés oxidativo en variedades tolerantes al almacenamiento en frío. El tratamiento *Plastificado* reduce la cantidad de peróxido de hidrógeno en las variedades *Sinatra* y *Natura*, por lo que el plastificado de los frutos reduce el estrés oxidativo en las variedades sensibles y en las tolerantes al almacenamiento en frío. Este efecto no se traduce en una reducción del contenido en malondialdehído en ninguna de las dos variedades estudiadas en las condiciones de este ensayo.

QUINTA: El tratamiento *Plastificado* mejora notablemente la calidad en la vida poscosecha de los frutos, siendo aconsejable su aplicación como tratamiento poscosecha en calabacín. Aunque otros tratamientos como el de *Acondicionamiento* mejoran la calidad en la vida poscosecha, no han resultado lo suficientemente eficaces como para ser aconsejados en calabacín.

# 6 | Bibliografía

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, F.B.; Morgan, P.W.; Saltveit, M. (1992). Ethylene in Plant Biology. Academic Press. (2nd. edition). San Diego, California.
- Alexander, L., Grierson, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: A model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 53 (377), pp. 2039-2055.
- 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, pag: 1337–1344.
- Artés, F. (1995). Innovaciones de los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas en la postrecolección. I Pretratamientos térmicos. *Rev. Esp. Ciencia Tecnol. Alim.* 35: 45-64, 35: 139-149 y 35: 247-269.
- Artés, F. (1999). Innovaciones tecnológicas para mejorar la calidad de la naranja y mandarina en la postrecolección. IV Congr. Citricultura. La Plana. Edit. Promociones LAV. 181-205.
- Artés, F.; Artés-Hernández, F. (2003). Daños por frío en la postselección de frutas y hortalizas. *Avances en Ciencias y Técnicas del Frío-1*. Edit: UPCT y SECYTEF. Cartagena, Murcia. pp: 299-310.
- Azcon-Bieto, J. y Talon, M. 1993. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1a edición. España. (1993).
- Bacarin, M. A., Deuner, S., Da Silva, F.P., Cassol, D., Moura Silva, D. (2011). Chlorophyll a fluorescence as indicative of the salt stress on *Brassica napus* L. *Braz. J. Plant Physiol.*, 23(4): 245-253.
- Balandrán-Quintana, R.R, Mendoza-Wilson, A.M.; Gardea-Béjar, A.A., Vargas-Arispuro, I, Martínez-Téllez, M.A. (2003). Irreversibility of chilling injury in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.) could be a programmed event long before the visible symptoms are evident. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307:553-557.
- Beaudry, R.M., (1999). Effect of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality *Postharvest Biology and Technology*, 15 (3), pp. 293-303.
- Blanco-Díaz, M.T., Del Río-Celestino, M., Martínez-Valdivieso, D., Font, R. (2014) Use of visible and near-infrared spectroscopy for predicting antioxidant

- compounds in summer squash (*Cucurbita pepo* ssp. *pepo*). Food Chemistry 164 (2014) 301–308.
- Blanco-Díaz, M.T., Pérez-Vicente, A., Del Río-Celestino, M., Fayos, A., Font, R (2014). VIII congreso Ibérico de Agroingeniería y ciencias Hortícolas. Madrid. Caracterización morfológica, química y nutricional de variedades comerciales de calabacín recolectadas en dos estados de madurez
- Blokhina, O. (2000). Anoxia and Oxidative Stress: Lipid Peroxidation, Mitochondrial Functions in Plants Antioxidant Status and Mitochondrial Functions in Plants. Academic Dissertation, December 2000. University of Helsinki, Faculty of Science, Department of Biosciences.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. Food Technology, 32(7), 62–66 72.
- Bramlage, W.J. 1982. CI of crops of temperate origin. HortScience 17 (2): 165-168.
- Bruinsma, J. (1963). The quantitative analysis of chlorophyll a and b in plant extracts. Protochem and Photobiol 2: 241-249.
- Capellini, R.A.; Ceponis, M.J.; Lightner, G.W. (1998). Disorders in cucumber, squash and watermelon shipments to New York market, 1972-1985. Plant Disease., 72:81-85.
- Carvajal, F.; Martínez, C.; Jamilena, M.; Garrido, D. (2011). Differential response of zucchini varieties to low storage temperatura. Scientia Horticulturae., 130:90-96.
- Cassol, D., De Silva, F., Falqueto, R.A., Bacarin, M.A. (2008). An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. PHOTOSYNTHETICA 46 (4): 634-636.
- Cate, T.M., Perkins, T.D. (2002). Chlorophyll content monitoring in sugar maple (*Acer saccharum*). – Tree Physiol. 23: 1077- 1079, 200.
- Chávez-Franco, S., Kader, A. (1993). Effect of CO<sub>2</sub> on Ethylene Biosynthesis in 'Bartlett' Pears. Postharvest Biology and Technology. An International Journal, 3:183-190.
- Church, N. (1994). technologies. Trends in Food Science and Technology, 5 (11), pp. 345-352.
- Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Decreto 402/2008.<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/areastemati>

cas/industriasagroalimentarias/produccion/mercadosagrarios/registromercados-agrarios.html

Corbineau, F., Côme, D. (1994). *Acta Horticulturae*, 354, pp. 9-15.

Costache, M.A., Campeanu, G., Neata, G. (2012). Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables Romanian *Biotechnological Letters* Vol. 17, No.5, 2012.

Decker D.S. (1988). Origin(s), evolution, and systematics of *Cucurbita pepo* L. (*Cucurbitaceae*). *Economic Botany* 42: 4-15.

Esterbauer, H., Schaur, R., Zolhner, H., (1999). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynomenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, 11, pag: 81-128.

Estrada, A., Roncal, L., (2014). Refrigeración y congelación de productos agroindustriales. Universidad de Trujillo.

F.A.O (2014).FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Última consulta: 15/05/14.

Faust, M.; Wang, S. 1992. Polyamines in horticulturally important plants. *Horticultural Reviews* (Estados Unidos) v.14, p. 333-356.

Field, R.J. (1990) Influence of chilling stress on ethylene production. En: C.Y. Wang. (Ed), *Chilling injury of horticultural crops*, CRC Press, Boca Raton, FL.

Fukshansky, L., von Remisowsky, A.M., McClendon, J., Ritterbusch, A., Richter, T., Mohr, H.(1993). Absorption spectra of leaves corrected for scattering and distributional error – a radiative transfer and absorption statistics treatment. – *Photochem. Photobiol.* 57: 538-555, 1993.

Fundación Cajamar (2013). Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería. Campaña 2012/2013.

Ghafir, S.A.M., Ibrahim, I.Z., Zaid, S.A., Abusrewel, G.S. (2010). Response of local variety 'Shlefy' pomegranate fruits to packaging and cold storage. *Acta Horticulturae*, 877, pp. 427-432.

García-Breijo, F.J. (2009). *Baya*. Botánica. Universidad Politécnica de Valencia.

Goñi, O., Sanchez-Ballesta, M.T., Merodio, C., Escribano, M.I. (2012). Biomarcadores de tolerancia a bajas temperaturas activados por altas concentraciones de CO<sub>2</sub>. (ICTAN-CSIC).

- Hawkins, J.A., Sawyer, J.E., Barker, D.W., Lundvall, J.P. (2007). Using relative chlorophyll meter values to determine nitrogen application rates for corn. – *Agron. J.* 99: 1034-1040.
- Hernández-Bermejo, J.E.; León, J. (1994). *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective*. Plant Production and Protection Series No. 26. FAO, Roma, Italia. pp: 63-77.
- Illie, M., Margina, D., (2012). Trends in the evaluation of lipid peroxidation process.
- Kader, A.A. (ed), (1992). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Second edition, Univ. Calif., Div. of Agr. And Nat. Resources, Publ. 3311: 296.
- Kalamaki, M.S. (2003). The influence of transgenic modification of gene expression during ripening on physicochemical characteristics of processed tomato products, p. 155. D.Phil. Dissertation. University of California, Davis, CA. UMI Digital Dissertations, Ann Arbor, MI.
- Karakurt, Y., Huber, D.J. (2003). Activities of several membrane and cell-wall hydrolases, ethylene biosynthetic enzymes, and cell wall polyuronide degradation during low-temperature storage of intact and fresh-cut papaya. *Postharvest Biology and Technology*, 28 (2), pp. 219-229.
- Kitinoja, L. y Kader, A.A. 2003. *Técnicas de Manejo Postcosecha a pequeña escala: Manual para los Productos Hortofrutícolas*. 4a Ed. Univ. Calif. Series Horticultura No.8. Universidad de California Davis. California, EUA.
- Knee, M. (2002). Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press. pp. 180-224.
- Lafuente, M.T., Zacarias, L. (2006) *Stewart Postharvest Review*, 2 (1), pp. 1-9.
- Leisso, R., Buchanan, D., Lee, J., Mattheis, J., Rudell, D. (2013). Cell wall, cell membrane, and volatile metabolism are altered by antioxidant treatment, temperature shifts, and peel necrosis during apple fruit storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 61, Issue 6, 13 February 2013, Pages 1373-1387.
- Levitt, J. (1980). *Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses*, 1, p. 23. 2nd. Ed.
- Lyons, J.M. y R.W. Breidenbach. 1990. Relation of chilling stress to respiration. Pág. 223-233 In C.Y. WANG (eds), *Chilling Injury of horticultural crops*. CRC Press Inc.

- Luchsinger, L. y Artés, F. (2000). Alleviating chilling injuries in stone fruit. En: Improving Postharvest Technologies for Fruits, Vegetables and Ornamentals. Edit. Intern. Institute of Refrigeration. Eds: F. Artés, M.I. Gil y M.A. Conesa. II: 474-479.
- Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology.*, 14: 257-269.
- Lurie, S., Watkins, C.B. (1989). Superficial scald, its etiology and control. *Postharvest Biology and Technology*, 65, pp. 44-60.
- M.A.G.R.A.M.A (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (2014). Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos, resultados 2013.
- M.A.G.R.A.M.A (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (2014). Avances en superficies y producciones de cultivos, abril 2014.
- Mathooko, F.M. (1996). Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biology and Technology*, 7 (1-2), pp. 1-26.
- Martínez-Tellez, 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.). *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 295:98–101.
- Marcellin, P. (1992). Les maladies physiologiques du froid. En: *Les végétaux et le froid*. Ed. D. Côme. Edit. Hermann. París. 53-105.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed. Academic Press, London.
- Massolo, J.F., Concellón, A., Chaves, A.R., Vicente, A.R. (2012). Use of 1-methylcyclopropene to complement refrigeration and ameliorate chilling injury symptoms in summer squash (2013) *CYTA - Journal of Food*, 11 (1), pp. 19-26.
- Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., Barrera, A., Rosales, R., Valenzuela, J.L., Garrido, D., Jamilena, M. (2014). Cold-induced ethylene in relation to chilling injury and chilling sensitivity in the non-climacteric fruit of zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *LWT - Food Science and Technology*. Volume 57, Issue 1, June 2014, Pages 194-199.
- Megías, Z., Manzano, S., Martínez, C., Barrera, A., Garrido, D., Valenzuela, J.L. and Jamilena, M. (2013). Effects of 1-MCP on different postharvest quality



- parameters in zucchini. VI International Postharvest Conference, Managing Quality in Chains. 2nd - 5th September 2013. Cranfield University, UK.
- Megías, Z.; Manzano, S.; Martínez, C.; Valenzuela, J.L.; Garrido, D.; Jamilena, M. (2012). Ethylene production by fruits of zucchini cultivars differing in postharvest fruit quality and tolerance to chilling injury. *Cucurbitaceae 2012, Proceedings of the Xth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae* (eds. Sari Solmaz and Aras) Antalya (Turkey), October 15-18th, 2012., pp: 638-642.
- Motomura, Y., Nishizawa, T., Kumpoun, W., (2013). Changes in peel color and cuticle components of mango skin affected by temperature treatment after harvest. *Acta Horticulturae*. Volume 1012, 15 November 2013, Pages 155-160.
- Muntean E., V.Lazăr, N. Muntean. (2006). HPLC - PDA analysis of carotenoids and chlorophylls from *Cucurbita pepo* L. con var. giromontina fruits .*Buletinul USAMV-CN*, 62/2006 (94-99).
- Namesny, A. (Coordinadora). (1997). *Melones*. Ediciones de Horticultura. Barcelona. Nee, M., (1990). The domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Econ. Bot*: 44, 56-68.
- Naram Naidu, L. , Hari Babu, K., Purushotham, K., Yuvaraj, K.M., Venkata Ramana, C., Rajasekhar, M. (2013). Activity of cell wall softening enzymes and its relation to fruit firmness during chemically regulated ripening tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Acta Horticulturae* Volume 1012, 15 November 2013, Pages 521-526.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun; 95(2):351-8.
- Osorio-Mora, O. y Zacarías, L. 2000. Efecto de las bajas temperaturas en la biosíntesis de etileno en discos de flavedo de la mandarina 'Fortune'. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 3: 53-64.
- Paris H.S. (1989). Historical records, origins, and development of edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany* 43: 423-443.
- Paris H.S. (2001). History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Reviews* 25: 71-170.
- Perez-Vicente. L., (2001). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. *Proceedings of the 2nd International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, may 2002*.

- Purvis, A.C. (2002). Diphenylamine reduces chilling injury of green bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology* 25 (2002) 41–48.
- Rajinder Kumar Dhall, Sanjeev R. Sharma, B. V. C. Mahajan (2012). *Journal of Food Science and Technology*, August 2012, Volume 49, Issue 4, pp 495-499.
- Rahman, M.S., Al-Farsi, S.A., (2005). Instrumental texture profile analysis (TPA) of date flesh as a function of moisture content *Journal of Food Engineering*, 66 (4), pp. 505-511.
- Reche, J. (1997). Cultivo de calabacín en invernadero. Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos Agrícolas de Almería.
- Rivera, F., (2005). Parámetros indicadores de inducción y protección al daño por frío (DPF) en frutos de limón 'Mexicano' (*Citrus aurantifolia* S.). Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana (México).
- Royo, C. (2010). Respuesta de los frutos cítricos a las bajas temperaturas: estudio mediante micromatrices. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Rubio A. (2010). Efecto de las auxinas sintéticas sobre la producción de etileno y la poscosecha en diferentes variedades de calabacín. Memoria Monográfica Fin de Carrera. Universidad de Almería.
- Saborío, D., Sáenz, V., Arauz, L.F., Bertsch, F., (2000). Efecto del calcio en aplicaciones precosecha y poscosecha sobre la severidad de antracnosis y la calidad de frutos de papaya. *Rev. Agronomía Costarricense* 24(2): 77-88.
- Saltveit, M.E., Morris, L.L. (1990) Chilling Injury of Horticultural Crops., pp. 3-15. In: Wang CY, editor. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Sánchez, M.T. (2003). Procesos de elaboración de alimentos y bebidas 13: 339-376. Mundi-Prensa, Madrid. [<http://biblioteca-pdf.blogspot.fr/2012/11/procesos-deelaboracion-de-alimentos-y.html>].
- Sanjur, O.I., Piperno, D.R., Andres, T.C., Wessel-Beaver, L., (2002). Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of Cucurbita (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:535-540.
- Sen, F. (2013). Farklı Ambalajlarda Muhafaza Edilen Hıyar (*Cucumis sativus* L.) Meyvelerinin Kalite Değişimleri Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 8 (1):60-70, 2013.
- Sevillano, L., Sánchez-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.
- Shewfelt, R.L., (1990). Sources of variation in the nutrient content of agricultural commodities from the farm to the consumer.- *Food Qual.* 13:37.
- Sois A. (1980). Prove di conservazione a breve termine di zuchine. Istituto Sperimentale per la Valorizzazione Tecnologica dei Prodotti Agricoli. Milan.
- Song, J., Gardner, B.D., Holland, J.F., Beaudry, R.M. A method to detect diphenylamine contamination of apple fruit and storages using headspace solid phase micro-extraction and gas chromatography/mass spectroscopy. *Food Chemistry.* Volume 160, 1 October 2014, Pages 255-259.
- Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K., Pleijel, H. (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. – *Photosynth. Res.* 91: 37-46.
- Viñas, I., Recasens, I., Usall, J., Graell, J., (2013). Poscosecha de pera, manzana y melocotón. Edit. MundiPrensa. Universidad de Lleida. Pags: 103-107.
- Wang, C.Y. (2000). Postharvest techniques for reducing low temperatura injury in chilling-sensitive commodities. En: *Improving Postharvest Technologies for fruits, vegetables and ornamentals.* Edit. Intern. Institute of Refrigeration. Eds: F. Artés, M.I. Gil y M.A. Conesa. II: 467-473.
- Wang, C.Y. (2006). Reducing chilling injury and maintaining quality of horticultural crops with natural products and their derivates. *Acta Horticulturae.*, 712:285-290.
- Wang, C.Y. (1996). Temperature preconditioning affects ascorbate antioxidant system in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology.*, 8: 29-36.
- Wang, Q.B., Chen, M.J., Li, Y.C. (2004). Nondestructive and rapid estimation of leaf chlorophyll and nitrogen status of peace lily using a chlorophyll meter. – *J. Plant Nutr.* 27: 557-569, 2004.
- Watada, A.E. 1982. CI of horticultural crops: Introduction. *HostScience* 17(2): 160.
- Wien, H.C. (1997). The cucurbits: cucumber, melon, squash and pumpkin. En: Wien HC (ed), *The physiology of vegetable crops.*CAB International, New York, pp: 345–386.

Wijeratnam, W., Hewajulige, I., Abeyratne, N., (2005). Postharvest hot water treatment for the control of Thielaviopsis black rot of pineapple. *Postharvest Biology and Technology* 36 (2005) 323–327.

Zhang, X., Lu, H., Lu, I., Zeng, L. Fu, D., Xiang, H., (2008). Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodosporidium paludigenum* against *Penicillium expansum* in apple fruit.